

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS – BIOQUÍMICA

NADHINE DE ASSIS RIOS

**Regulação pós-traducional da nitrogenase por anaerobiose em *Azospirillum
brasiliense***

CURITIBA
2017

NADHINE DE ASSIS RIOS

**Regulação pós-traducional da nitrogenase por anaerobiose em *Azospirillum
brasiliense***

Dissertação apresentada como requisito parcial
a obtenção do título de Mestre em Ciências –
Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas
da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel M. de Souza

Coorientador: Dr. Vivian Rotuno Moure

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Rios, Nadhine de Assis

Regulação pós-traducional da nitrogenase por anaerobiose em
Azospirillum brasilense. / Nadhine de Assis Rios. – Curitiba, 2017.
97 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Emanuel M. de Souza

Coorientador: Vivian Rotuno Moure

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. *Azospirillum brasilense* 2. Anaerobiose 3. Nitrogenase I. Título II.
Souza, Emanuel Maltempi de III. Moure, Vivian Rotuno Moure IV.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 589.95



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)
Código CAPES: 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **NADHINE DE ASSIS RIOS**, intitulada: "**Regulação pós-traducional da nitrogenase por anaerobiose em *Azospirillum brasilense***", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua A PROVAÇÃO.

CURITIBA, 25 de Maio de 2017.

EMANUEL MALTEMPI DE SOUZA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ANA CLAUDIA BONATTO
Avaliador Externo (UFPR)

LUCIANO FERNANDES HUERGO
Avaliador Interno (UFPR)

Dedico este trabalho à minha mãe,
Thelma Meira de Assis,
e ao meu avô,
Cléo de Assis (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pela confiança depositada em mim;

À minha coorientadora Dr^a. Vivian Rotuno Moure, principalmente pela paciência e disposição em me ajudar, pelos ensinamentos, pelo apoio e pelo seu exemplo de dedicação;

Aos membros da banca examinadora, os professores Luciano F. Huergo e Ana Claudia Bonatto pelas conversas, sugestões, correções e críticas pertinentes;

Aos meus colegas do laboratório 279, Cícero, Luis, Maria Luíza, Marina, Maritza e Sílvia, pela amizade, pelo companheirismo e pela ótima convivência que tornaram a realização deste trabalho mais fácil;

A todos os professores do grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio pela ajuda, motivação e discussões;

A todos os amigos do grupo de Fixação e dos demais departamentos, pela ajuda, pelos empréstimos de material e equipamentos, pelas discussões, dicas, e convívio, em especial a Edileusa, por toda a paciência e auxílio prestado e ao Prof. Silvio Zanata, e alunos do Departamento de Patologia Básica, pela disponibilização da ultra centrífuga;

Aos técnicos Dona Rose, Valter e Lu, pelo apoio técnico que exercem com tanta dedicação, que facilita grandemente nosso trabalho;

Ao programa de Pós-graduação em Bioquímica da UFPR;

Às agências financiadoras, CAPES, CNPq, ao programa PRONEX e a FUNPAR pelo suporte financeiro;

À minha família e aos meus amigos, por todo amor, apoio, confiança na minha capacidade e por compreenderem a importância deste trabalho;

E a todos que, de alguma forma, participaram desta etapa da minha vida e que contribuíram para meu crescimento profissional, científico e pessoal.

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio é catalisada pelo complexo enzimático nitrogenase. Este complexo contém duas metaloproteínas: as proteínas Fe e MoFe. Em *Azospirillum brasilense*, objeto deste estudo, a regulação pós-traducional envolve a modificação covalente de uma das subunidades da proteína Fe por ADP-ribosilação. Esta ADP-ribosilação inativa reversivelmente a proteína Fe e é catalisada pela dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase (DraT) em resposta ao aumento de íons amônio ou depleção da energia celular. O grupo ADP-ribosil é removido pela dinitrogenase redutase glicohidrolase (DraG), promovendo reativação da proteína Fe e consequentemente, da nitrogenase. Em resposta ao aumento de íons amônio, as proteínas PII, assim como a proteína de membrana AmtB, estão envolvidas no sistema de regulação atuando principalmente por interação direta com proteínas alvo. No caso de *A. brasilense*, as proteínas PII são denominadas de GlnB e GlnZ e interagem com DraT e DraG, respectivamente, regulando suas atividades. Porém o mecanismo pelo qual estas enzimas são reguladas pelos níveis energéticos celulares não é totalmente conhecido. O objetivo deste trabalho foi contribuir para elucidação do mecanismo da regulação pós-traducional da nitrogenase em condições de anaerobiose. Vários aspectos da regulação do metabolismo energético nesta bactéria foram estudados. Para avaliar o envolvimento de AmtB e GlnZ de *A. brasilense* na regulação da nitrogenase, foi realizado um ensaio de desligamento / religamento da nitrogenase por anaerobiose em mutantes nos respectivos genes. Os resultados mostraram que as proteínas GlnZ e AmtB não participam diretamente da regulação por ADP-ribosilação da nitrogenase. Análises de LC-MS dos níveis de ATP e ADP indicaram redução substancial quando a cultura foi exposta à anaerobiose. Além disso, a adição do desacoplador CCCP, que diminui o ATP intracelular, causou desligamento e ADP-ribosilação da nitrogenase. Portanto, razão ATP/ADP pode estar relacionada ao mecanismo de regulação da atividade da nitrogenase nessas condições. Análise das frações celulares mostrou que, diferentemente da regulação por íons amônio, as proteínas PII não vão para a membrana durante a ADP-ribosilação da nitrogenase. O mesmo ocorre com DraG que permanece no citoplasma. Os resultados sugerem a existência de diferentes vias para o controle da atividade da nitrogenase, que depende do estímulo ao qual as células são submetidas.

Palavras-chave: *Azospirillum brasilense*, regulação pós-traducional, ADP-ribosilação da proteína Fe, sistema DraT/DraG, anaerobiose.

ABSTRACT

The biological nitrogen fixation is catalyzed by a nitrogenase enzymatic complex. This complex contains two metalloproteins: the Fe and MoFe proteins and undergoes to post-translational modification. In *Azospirillum brasilense*, object of this study, this posttranslational regulation involves the covalent modification in one of the subunits of Fe protein by ADP-ribosylation. This ADP-ribosylation reversibly inactivates the Fe protein and is catalyzed by dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) in response to an increase of ammonium concentration or decrease of cellular energy. The ADP-ribosyl group is removed by dinitrogenase reductase glycohydrolase (DraG), promoting Fe protein and, consequently, nitrogenase re-activation. In response to increased ammonium ions, the PII proteins, as well as the NH_3 – channel AmtB, are involved in the regulatory system acting primarily by direct interaction with the target proteins. In *A. brasilense*, the PII proteins are denominated GlnB and GlnZ and interact with DraT and DraG, respectively, regulating DraT and DraG activities. However, the mechanism by which these enzymes are regulated by cellular energy levels is not fully known. The goal of this study was to contribute to the elucidation of the mechanism of post-translational nitrogenase regulation under anaerobic conditions. Several aspects of energy metabolism regulation in this bacterium were studied. To evaluate the involvement of *A. brasilense* AmtB and GlnZ in the regulation system, switch-off / on assays of nitrogenase by anaerobiosis were performed. The results confirmed that GlnZ and AmtB proteins do not directly participate in ADP- ribosylation of nitrogenase. LC-MS analysis of ATP and ADP levels showed a marked reduction when the culture was exposed to anaerobic conditions. Furthermore, addition of CCCP, which decreases intracellular ATP, caused switch-off and ADP-ribosylation of nitrogenase. Therefore, the ATP / ADP ratio, lead nitrogenase switch-off. Analysis of the cellular fractions, showed that, unlike the regulation by ammonium ions, the PII proteins did not migrate to the membrane during nitrogenase switch-off, and DraG also remained in the cytoplasm. The results suggest distinct pathway for the control of nitrogenase activity depending on which stimulus the cells are submitted to.

Key words: *Azospirillum brasilense*, post-translational regulation, ADP-ribosylation, DraT / DraG system, anaerobiosis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - O CICLO REDOX DO NITROGÊNIO.....	19
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DO COMPLEXO DA NITROGENASE EM <i>RHODOSPIRILLUM RUBRUM</i>	22
FIGURA 3 – MECANISMO DE REAÇÃO DA NITROGENASE	23
FIGURA 4 - CICLOS CATALÍTICOS DAS PROTEÍNAS Fe E FeMo	24
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO EM VISTA SUPERIOR DA ESTRUTURA DE GLNZ DE <i>A. BRASILENSE</i>	28
FIGURA 6 – MODELO DA REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DE <i>nifA</i> PELA PII EM RESPOSTA AO NÍVEL DE NITROGÊNIO FIXADO	30
FIGURA 7 – PERFIL DE URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GLNB E GLNZ	31
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO DO COMPLEXO AMTB-GLNK DE <i>E. COLI</i>	36
FIGURA 9 – (A) MODELO ESTRUTURAL E (B) DE TRANSPORTE DE NH ₃ PROPOSTO PARA AMTB DE <i>E. COLI</i>	38
FIGURA 10 – CAMINHOS DE ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIA E REGULAÇÃO DA GLUTAMINA SINTETASE EM <i>E. COLI</i>	40
FIGURA 11 – ESQUEMA DA REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA NifH POR ADP-RIBOSILAÇÃO REVERSÍVEL.....	41
FIGURA 12 – CONTROLE DO DESLIGAMENTO/RELIGAMENTO DA NITROGENASE POR ADP-RIBOSILAÇÃO EM <i>A. BRASILENSE</i>	42
FIGURA 13 – MODELO PARA O ENVOLVIMENTO DAS PROTEÍNAS PII, AMTB, DRAT, DRAG E EFETORES NA REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE EM <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i>	43
FIGURA 14 – REPRESENTAÇÃO DO COMPLEXO TERNÁRIO AMTB-GLNZ-DRAG.	44
FIGURA 15 – CURVA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE SELVAGEM DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i>	64
FIGURA 16 - REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE E ADP- RIBOSILAÇÃO POR ANAEROBIOSE	65
FIGURA 17 - ESTRUTURA QUÍMICA DO CARBONIL CIANETO M-CLOROFENIL HIDRAZONA (CCCP).	68

FIGURA 18 - MECANISMO GERAL DE AÇÃO DE UM DESACOPLADOR NA MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	69
FIGURA 19 – EFEITO DO CCCP NA ATIVIDADE DA NITROGENASE DA ESTIRPE FP2 DE <i>A. BRASILENSE</i>	70
FIGURA 20 - CINÉTICA DE ADP-RIBOSILAÇÃO DA PROTEÍNA FE NAS ESTIRPES FP2, 7611 E FAJ 310 DE <i>A. BRASILENSE</i> APÓS ADIÇÃO DE CCCP	71
FIGURA 21 – ESPECTRO DE MASSA DOS PADRÕES DOS METABÓLITOS ADP (A) E ATP (B) OBTIDOS EM ESPECTROMETRO MICROTOF-Q.....	73
FIGURA 22 - DOSAGEM DE METABÓLITOS INTRACELULARES EM <i>A. BRASILENSE</i>	74
FIGURA 23 - PERFIL DE MODIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GS DE <i>A. BRASILENSE</i> SUBMETIDO A ANAEROBIOSE	77
FIGURA 24 - ESQUEMA GRÁFICO DE REGULAÇÃO DA NITROGENASE POR ANAEROBIOSE.....	79
FIGURA 25 - CONTROLE DE REAÇÃO CRUZADA PARA OS ANTICORPOS ANTI-GLNB E ANTI-GLNZ	79
FIGURA 26 - ANÁLISE DAS PROTEÍNAS PII NAS DIFERENTES FRAÇÕES CELULARES DE <i>A. BRASILENSE</i> SUBMETIDAS AO CHOQUE ANAERÓBICO ...	80
FIGURA 27 - LOCALIZAÇÃO CELULAR DA PROTEÍNA DRAG EM CÉLULAS DE <i>A. BRASILENSE</i> FP2 PLHMPThisGN2.	82
FIGURA 28 - LOCALIZAÇÃO CELULAR DA PROTEÍNA DRAG EM CÉLULAS DE <i>A. BRASILENSE</i> FP2 PLHMPThisGN2 INDUZIDAS COM 0,2 mM DE IPTG	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTIRPES DE <i>A. BRASILENSE</i> E ANTIBIÓTICOS.....	49
TABELA 2 - PLASMÍDEOS.....	50
TABELA 3 – (A) COMPOSIÇÃO DO MEIO NF _{BHP} ; (B) MISTURA DE FOSFATOS PARA <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i>	51
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA LURIA-BROTH (LB).	52
TABELA 5 - ANTICORPOS UTILIZADOS E SUAS RESPECTIVAS DILUIÇÕES.	52
TABELA 6 - TAMPÕES DE TRANSFERÊNCIA.....	56
TABELA 7 - RELAÇÃO DAS MÉDIAS DAS ÁREAS DOS PICOS DE ATP E ADP NOS DIFERENTES TEMPOS NAS ESTIRPES FP2, FAJ310 E 7611 DE <i>A. BRASILENSE</i>	76

LISTA DE ABREVIATURAS

2-OG	-	2-oxoglutarato
ADP 5'	-	5' difosfato de adenosina
AMP 5'	-	5' monofosfato de adenosina
AmtB	-	transportador de amônia transmembrana
ATase	-	enzima adenililtransferase
ATP 5'	-	5' trifosfato de adenosina
BSA	-	Albumina bovina
Cm ^r	-	resistência a cloranfenicol
DO ₆₀₀	-	densidade óptica a 600 nm
DNA	-	ácido desoxirribonucleico
DraG	-	dinitrogenase redutase glicohidrolase
DraT	-	dinitrogenase ADP-ribosil transferase
DTT	-	ditiotreitól
e ⁻	-	elétron
EDTA	-	ácido etilenodiamino-tetra ético
EMBRAPA	-	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Fe-ADPR	-	proteína Fe ADP-ribosilada
GDH	-	glutamato desidrogenase
GLN	-	glutamina
GlnB-UMP	-	proteína GlnB uridililada
GlnD	-	enzima que catalisa a uridililação e desuridililação denproteínas PII
GlnZ-UMP	-	proteína GlnZ uridililada
GLU	-	glutamato
GOGAT	-	glutamato sintase
GS	-	glutamina sintetase
GS-AMP	-	proteína GS adenililada
IPTG	-	β-D-isopropil-tiogalactopiranosideo
kΩ	-	quilo ohms
kV	-	quilo volts
Km ^r	-	resistência a canamicina

L	-	litro
LC/MS	-	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
m/v	-	massa por volume
MALDI-TOF	-	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption</i>
Mha	-	milhões de hectares
Mt	-	milhões de toneladas
NAD ⁺	-	nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	-	nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido
NADP ⁺	-	fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
NADPH	-	fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido
Nal ^r	-	resistência a ácido nalidíxico
NifH	-	proteína Fe ou dinitrogenase redutase
NifH-ADPR	-	proteína NifH-ADP-ribosilada
PCR	-	reação em cadeia da polimerase
Pi	-	fosfato inorgânico
PVDF	-	Fluoreto de Polivinilideno
RNA	-	ácido ribonucleico
rpm	-	rotação por minuto
RT	-	tempo de retenção
SDS	-	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	-	dodecilsulfato de sódio eletroforese em gel de poliacrilamida
Sm ^r	-	resistência a estreptomicina
TBST	-	Tris-salina tamponado e Tween 20
tris	-	Tris(hidroximetil)-aminometano
UMP	-	5' monofosfato de uracila
UR	-	removedora de uridilil
Utase	-	enzima uridililtransferase
UV	-	ultravioleta
v/v	-	volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	O ELEMENTO NITROGÊNIO	18
2.2	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	19
2.3	NITROGENASE	21
2.4	BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO	25
2.5	O GÊNERO <i>AZOSPIRILLUM</i>	25
2.6	PROTEÍNAS DA FAMÍLIA PII	26
2.6.1	<i>Estrutura das proteínas do tipo PII</i>	27
2.6.2	<i>Modificação pós-traducional das proteínas PII</i>	28
2.6.3	<i>Ligação de moléculas efetoras às proteínas PII</i>	32
2.6.4	<i>Proteínas PII de A. brasilense</i>	34
2.7	CAPTAÇÃO DE AMÔNIO	36
2.7.1	<i>Transportadores de amônio</i>	36
2.8	ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIO	38
2.9	REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DO NITROGÊNIO	40
2.9.1	<i>Regulação pós-traducional da atividade de nitrogenase por amônio</i>	40
2.9.2	<i>Regulação pós-traducional da atividade de nitrogenase por depleção de energia</i>	44
3	JUSTIFICATIVA	47
4	OBJETIVOS	48
4.1	GERAL	48
4.2	ESPECÍFICOS	48
5	MATERIAIS E MÉTODOS	49
5.1	ESTIRPES DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i>	49
5.2	PLASMÍDEOS	50
5.3	MEIOS DE CULTURA	50
5.3.1	<i>Meios para o cultivo de A. brasilense</i>	50
5.3.2	<i>Meios para cultivo de Escherichia coli</i>	51

5.4	ANTIBIÓTICOS.....	52
5.5	ANTICORPOS	52
5.6	CONDIÇÕES DE CULTIVO	52
5.7	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE	53
5.8	DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	54
5.9	DETERMINAÇÃO DO DESLIGAMENTO-RELIGAMENTO DA NITROGENASE EM RESPOSTA A ANAEROBIOSE (SWITCH-OFF ANAERÓBIO).....	54
5.10	ELETROFORESE DE PROTEÍNAS.....	55
5.10.1	<i>Eletroforese sob condições desnaturante (SDS-PAGE).....</i>	55
5.10.2	<i>Eletroforese sob condições nativas (Native-PAGE).....</i>	55
5.11	WESTERN BLOT	55
5.12	DETECÇÃO DE ANTICORPO ATRAVÉS DE UM ANTICORPO CONJUGADO COM FLUORÓFORO.....	57
5.13	ADIÇÃO DE CCCP	57
5.14	ANÁLISE DOS METABÓLITOS ADP, ATP E GLUTAMINA	58
5.14.1	<i>Preparo das amostras</i>	58
5.14.2	<i>Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa – LC-MS...59</i>	59
5.14.3	<i>Detecção dos metabólitos por Espectrometria de Massa e Análise dos dados obtidos</i>	59
5.15	TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE E. COLI	59
5.15.1	<i>Preparo de células competentes</i>	59
5.16	ELETROPORAÇÃO.....	60
5.17	MINI-PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS.....	60
5.18	CONJUGAÇÃO.....	61
5.19	PREPARAÇÃO DE FRAÇÃO DE MEMBRANA DE A. BRASILENSE	62
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
6.1	CURVA DE ATIVIDADE DA NITROGENASE DA ESTIRPE FP2 DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i>	63
6.2	DESLIGAMENTO / RELIGAMENTO ANAERÓBICO DA NITROGENASE POR ADP-RIBOSILAÇÃO DE PROTEÍNA FE.....	64
6.3	ADIÇÃO DE CCCP.....	68
6.4	POSSÍVEIS SINAIS METABÓLICOS ENVOLVIDOS NO DESLIGAMENTO ANAERÓBICO DA NITROGENASE.....	72

6.4.1 <i>Análise de modificação da GS em condições anaeróbicas</i>	76
6.5 LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS PROTEÍNAS PII	78
6.6 LOCALIZAÇÃO CELULAR DA PROTEÍNA DRAG DURANTE O DESLIGAMENTO DA NITROGENASE	81
6.7 EFEITOS DA AUSÊNCIA DA PROTEÍNA GLNB NA ATIVIDADE DA NITROGENASE	83
7 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

O processo de fixação biológica de nitrogênio é amplamente estudado devido a possibilidade de ser empregado para a otimização da produtividade agrícola, levando a diminuição do uso de fertilizantes nitrogenados (DIXON; KAHN, 2004). Esse processo ocorre em um restrito grupo de procariotos conhecidos como diazotrofos, que possuem o complexo metalo-enzimático nitrogenase que catalisa a redução do nitrogênio atmosférico (N_2) a amônia, às custas da hidrólise de ATP. A nitrogenase consiste de duas proteínas: a proteína Fe, NifH ou dinitrogenase redutase, que transfere elétrons para a segunda proteína, a MoFe, NifDK ou dinitrogenase que contém o sítio ativo (SEEFELDT; HOFFMAN; DEAN, 2009; ZHANG *et al.*, 1997). Devido ao elevado custo energético, a fixação de nitrogênio é altamente regulada a nível transcricional e pós-traducional.

Azospirillum spp. são bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a raízes de muitas culturas economicamente importantes (DÖBEREINER, 1991; DOBEREINER; DAY, 1976; ECKERT *et al.*, 2001). Em *Azospirillum brasilense*, objeto deste estudo, a regulação pós-traducional envolve a modificação covalente de uma das subunidades da proteína Fe por ADP-ribosilação. Esta ADP-ribosilação inativa reversivelmente a nitrogenase e é catalisada pela dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase (DraT). Para a reativação da proteína Fe, e consequentemente da nitrogenase, é necessária a remoção desse grupo ADP-ribosil, que é realizada pela glicohidrolase ativadora da dinitrogenase redutase (DraG). Esse sistema responde tanto aos níveis de NH_4^+ quanto de energia na célula (HUERGO *et al.*, 2006a; ZHANG *et al.*, 1994, 1997).

Com relação à resposta aos níveis de amônio, as proteínas transdutoras de sinal de nitrogênio celular PII assim como a proteína de membrana AmtB estão diretamente envolvidas no processo de regulação. Em *A. brasilense* existem duas proteínas PII denominadas GlnB e GlnZ, que interagem com DraT e DraG, respectivamente, regulando-as (HUERGO *et al.*, 2006b).

Entretanto, com relação à resposta aos níveis celulares de energia, não parece haver envolvimento das proteínas PII e de AmtB na regulação da proteína Fe (HUERGO *et al.*, 2006b). Sugerindo a existência de diferentes vias para o controle da atividade da nitrogenase, que depende a qual estímulo a célula foi submetida (HARTMANN; BURRIS, 1987; ZHANG *et al.*, 1993).

A via de sinalização envolvida no controle de DraT e DraG pela presença de íons amônio já foi bastante estudada, porém o mecanismo pelo qual estas enzimas são reguladas pelos níveis energéticos celulares não é totalmente conhecido. Existem algumas hipóteses sobre quais sinais metabólicos controlam a regulação do sistema DraT / DraG, como: a variação dos níveis de ATP, assim como da relação ATP / ADP, a variação dos níveis celulares de NAD⁺, pela depleção de energia da célula, a inativação de DraG pela associação independente de GlnZ e AmtB a membrana, ou então, a mudança do estado redox da célula, em anaerobiose, pode acarretar na modificação da proteína Fe (HUERGO *et al.*, 2012).

Com base nestas considerações, este trabalho pretende contribuir para elucidação do mecanismo da regulação pós-traducional da nitrogenase em condições de anaerobiose, analisando e testando as hipóteses levantadas até o momento, como também, propor outros possíveis sinais ou condições que possam estar envolvidos no processo de regulação da atividade do sistema DraT/DraG em resposta aos níveis energéticos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 O ELEMENTO NITROGÊNIO

O nitrogênio é um elemento fundamental para a síntese de importantes biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos. Portanto, este nitrogênio na sua forma molecular deve ser transformado, pois grande maioria dos organismos vivos obtém este elemento em alguma forma combinada, como nitrato, amônia e compostos mais complexos (SANT'ANNA, 2007). Entre os elementos essenciais à vida, como carbono, fósforo, oxigênio e enxofre, o nitrogênio é o único que não está prontamente disponível em reservatórios globais capazes de sustentar as diversas formas de vida (POSTGATE, 1982). Isto porque mais de 99% da massa de nitrogênio da Terra não está quimicamente disponível para a maioria dos organismos vivos (GALLOWAY et al., 2003). A forma predominante, o dinitrogênio (N_2), que constitui 80% da atmosfera terrestre, é bastante inerte, sendo sua assimilação somente possível pela ação de um conjunto de proteínas presente apenas em alguns procariotos. A estabilidade do gás N_2 se deve à presença de uma forte ligação tríplice entre os dois átomos de N ($N \equiv N$).

O nitrogênio pode existir em diferentes estados de oxidação, sendo a interconversão entre estes estados conhecida como o ciclo biogeoquímico do nitrogênio. Os processos que regulam este ciclo são governados por diversos fatores, sendo o mais importante o potencial redox (FIGURA 1), já que certos processos ocorrem somente aerobicamente e outros somente anaerobicamente (ROSSWALL, 1982). Em todos os ecossistemas a atividade de microrganismos tem papel fundamental na ciclagem do nitrogênio, como a conversão redutora do nitrato (NO_3^-) a N_2 (desnitrificação), a conversão oxidativa da amônia a nitrato (nitrificação) e a interconversão entre amônia e formas orgânicas de nitrogênio (assimilação e desaminação), processos importantes do ciclo do nitrogênio como repositores do conteúdo global de nitrogênio na biosfera (EADY, 1986; IGARASHI; SEEFELDT, 2003; POSTGATE, 1982).

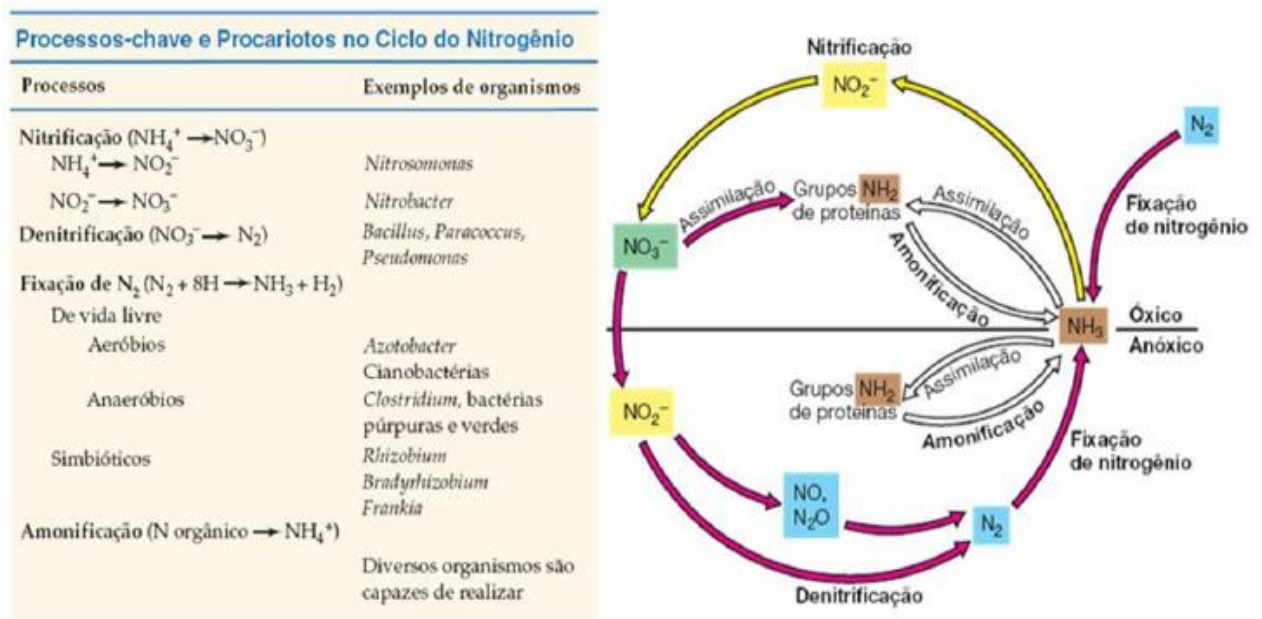


FIGURA 1 - O CICLO REDOX DO NITROGÊNIO

Fonte: Adaptado de (MADIGAN et al., 2004)

Nota: As reações de oxidação são indicadas pelas setas amarelas e as de redução pelas setas vermelhas. As atividades microbianas governam o ciclo global do nitrogênio. De fato, a distribuição geográfica das espécies bacterianas está intimamente relacionada à acessibilidade de nutrientes.

Como mencionado anteriormente, algumas bactérias desenvolveram mecanismos de utilização de N_2 , que precisa ser primeiramente reduzido para, então, ser assimilado (REITZER et al., 1996), deixando-o assim disponível para os outros seres vivos incapazes de tal processo. Esta atividade é essencial para o balanço de nitrogênio na atmosfera, já que parte do nitrogênio fixado é convertido a N_2 na desnitrificação (DIXON; KAHN, 2004).

2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A fixação de nitrogênio é o processo pelo qual o N_2 é convertido a NH_3 , forma metabolicamente utilizável, permitindo, dessa forma, a incorporação deste elemento às biomoléculas.

A fixação de N_2 ocorre de três maneiras diferentes: (i) através de processos geoquímicos, como o relâmpago, (ii) industrialmente, através do processo Haber-Bosch e (iii) biologicamente através da ação da enzima nitrogenase, encontrada apenas em um seleto grupo de microrganismos chamados de diazotrófos, a qual requer condições ambientais favoráveis (HOFFMAN et al., 2014). Entre estas,

incluem-se ausência de nitrogênio fixado, baixas tensões de oxigênio, presença de molibdênio e temperatura adequada (POSTGATE, 1982). Nitrogênio fixado e oxigênio afetam a expressão e atividade das proteínas envolvidas na fixação de nitrogênio nos diversos organismos estudados.

O elemento nitrogênio é um dos fatores limitantes para o desenvolvimento vegetal, e é também o mais caro dos fertilizantes agrícolas. A fixação biológica de N_2 é de grande importância econômica e ambiental, pois o uso de fertilizantes nitrogenados, além de elevar os custos da produção agrícola, pode gerar danos ecológicos (PEDROSA, 1987). Os danos ao ambiente causados pelo uso desses fertilizantes incluem eutrofização de rios e lagos, acidificação do solo e emissão de óxidos de nitrogênio na atmosfera. Além do efeito direto no solo, a produção de fertilizantes a base de nitrogênio demanda uma grande quantidade de energia, normalmente provida por combustíveis fósseis, aumentando a emissão de dióxido de carbono na atmosfera (DIXON; KAHN, 2004). O nitrogênio fornecido pelo processo de fixação biológica é menos propenso a lixiviação e volatilização já que ele é utilizado *in situ*, sendo assim, o processo biológico é uma alternativa barata, limpa e sustentável para o fornecimento de nitrogênio na agricultura comercial (CARVALHO; ZABOT, 2012).

Estima-se que a FBN tenha uma contribuição global para os diferentes ecossistemas da ordem de 258 milhões de toneladas de nitrogênio (N) por ano, sendo que a contribuição na agricultura é estimada em 60 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2013). No Brasil, o caso mais exitoso de sua contribuição é representado pela cultura da soja, pois, segundo dados da Embrapa (2013), com o processo de fixação biológica de nitrogênio, são economizados R\$ 898,00 / ha. Se considerado os 27,7 milhões de hectares plantados com soja no Brasil, a economia proporcionada pela não utilização de adubos nitrogenados é da ordem de R\$ 24,9 bilhões anuais. Ainda de acordo com dados apresentados pela Embrapa (2013), no Brasil, as culturas mais importantes, tanto pela extensão da área que ocupam como pelo alto consumo de fertilizantes, são soja, cana-de-açúcar, milho, feijão, arroz e trigo. Assim, a estimativa é de que, em 2030, juntas, estas culturas ocupem uma área superior a 70 Mha e o consumo de fertilizante nitrogenado será superior a 2,5 Mt.

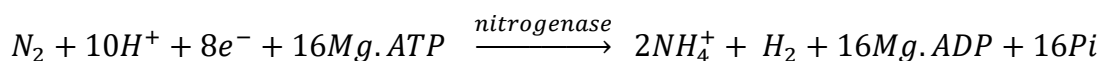
Tendo em vista os benefícios econômicos e ambientais dessa tecnologia, a utilização de microrganismos associativos capazes de fixar nitrogênio em outras culturas é de grande interesse.

As bactérias diazotróficas encontram-se associadas com raízes de plantas ou em vida livre no solo. O vegetal pode se beneficiar indiretamente desta fonte de nitrogênio fixado por meio de relações simbióticas ou associativas com bactérias, incorporando esse nitrogênio ao seu metabolismo. Como parte da cadeia alimentar, as plantas disponibilizarão os compostos nitrogenados para outros microrganismos ou animais que dela se alimentarem. Assim, de uma maneira ou de outra, todos os seres vivos obtêm parte de seu nitrogênio a partir da fixação biológica de nitrogênio realizada por bactérias diazotróficas (ATLAS; BARTHA, 1981). Portanto, o melhor entendimento do processo de fixação biológica de nitrogênio e sua regulação são fundamentais.

O entendimento desse processo biológico passa pelos conhecimentos das espécies capazes de fixar o nitrogênio e sua classificação filogenética. Passa também pelo entendimento dos mecanismos de regulação e proteção da nitrogenase e pela compreensão dos processos enzimáticos ligados à assimilação do nitrogênio fixado nas células microbianas e sua interação com a nitrogenase.

2.3 NITROGENASE

O processo de fixação de nitrogênio é catalisado por uma enzima chamada nitrogenase (POSTGATE, 1982), segundo a reação a seguir.



Nitrogenases são metaloenzimas sensíveis a oxigênio com estrutura e mecanismos de catálise conservados. Estas enzimas são classificadas de acordo com o grupamento metálico que constitui seu sítio ativo (Mo, V ou somente Fe) (IGARASHI; SEEFELDT, 2003). O modelo estrutural do complexo nitrogenase de *Rhodospirillum rubrum* é representada na FIGURA 2.

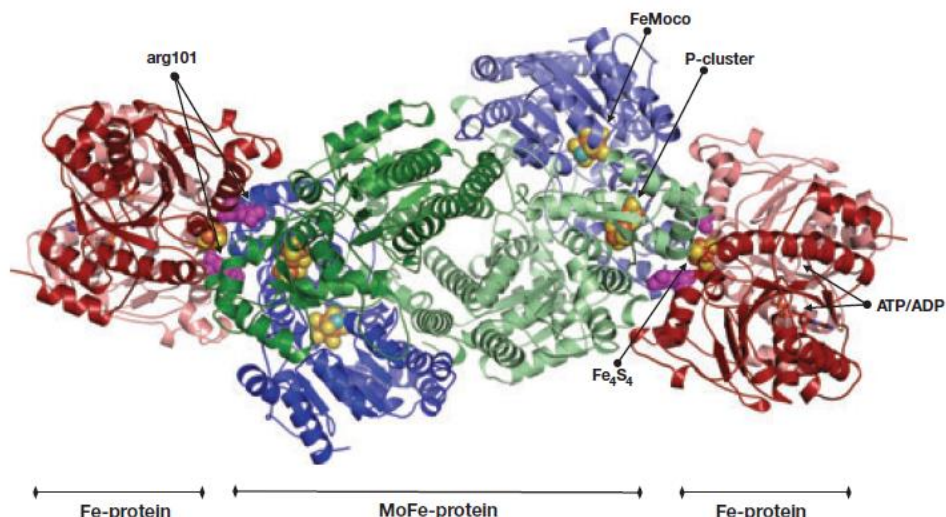


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DO COMPLEXO DA NITROGENASE EM *Rhodospirillum rubrum*

Fonte: Nordlund e Högbom (2013).

Nota: A subunidade α da proteína MoFe é mostrada em azul e a subunidade β é mostrada em verde. A proteína Fe está representada em vermelho, e os clusters metálicos estão indicados pelas bolinhas amarelas. A arginina Arg101 da proteína Fe, onde ocorre a ligação do grupo ADP-ribosil, quando inativada é apresentada em magenta.

O complexo da nitrogenase é composto por duas metaloproteínas: a dinitrogenase redutase (proteína Fe ou NifH, codificada pelo gene *nifH*), e pela dinitrogenase (proteína MoFe ou NifDK produto dos genes *nifDK*) (DIXON; KAHN, 2004). A proteína NifH é um dímero (γ_2), e contém um núcleo $[4\text{Fe-4S}]$ cuja função é transportar elétrons até a proteína NifDK, com gasto de 2 ATP por elétron transferido. A proteína NifDK, por sua vez, é um tetrâmero ($\alpha_2\beta_2$) contendo dois pares de grupos prostéticos: dois centros P $[8\text{Fe-7S}]$ e dois cofatores FeMo. Este último grupo prostético contém Mo, Fe, S, e também uma molécula de homocitrato ligado e um átomo central que provavelmente é carbono. O cofator FeMo é o sítio catalítico da enzima (DEAN et al., 1993; LANCASTER et al., 2011).

A proteína NifH contendo a forma reduzida do núcleo metálico $[4\text{Fe-4S}]^{+1}$, liga duas moléculas de MgATP. A ligação do MgATP altera a conformação de NifH e altera o potencial de oxi-redução do núcleo $[4\text{Fe-4S}]$, tornando-o menor, e promovendo sua associação com a proteína NifDK. A formação do complexo NifH – NifDK permite a transferência de um elétron da NifH para o cofator FeMo da proteína NifDK. Concomitante à transferência de elétron, ocorre a hidrólise das duas moléculas de MgATP ligadas a NifH, assim, fosfato inorgânico é liberado e a proteína NifH oxidada fica ligada a MgADP, e então o complexo NifH – NifDK é desfeito. Para completar o

ciclo, a NifH oxidada é novamente reduzida por um doador de elétrons (uma ferredoxina ou flavodoxina), e as duas moléculas de MgADP são substituídas por MgATP. O ciclo catalítico é repetido até que um número suficiente de elétrons seja transferido para que a proteína NifDK reduza seu substrato (KLASSEN *et al.*, 2005; MOURE *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2001a). As FIGURAS 3 e 4 ilustram os ciclos catalíticos das proteínas Fe e MoFe descritos acima.

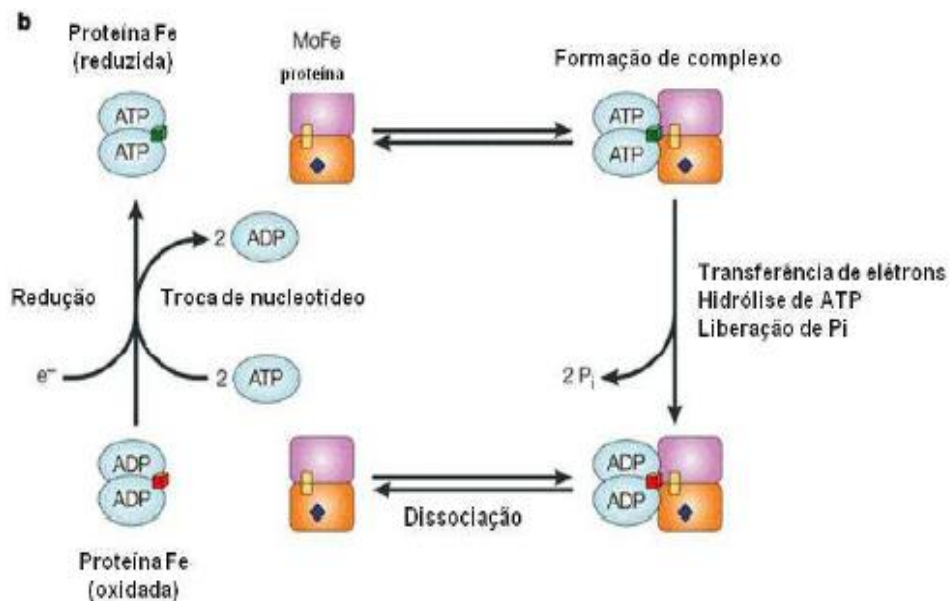


FIGURA 3 – MECANISMO DE REAÇÃO DA NITROGENASE

Fonte: Dixon *et al.* (2004)

Nota: A ciclo de associação/dissociação da proteína Fe à proteína FeMo com consequente redução de suas subunidades. A proteína Fe é apresentada em azul e FeMo em rosa e laranja.

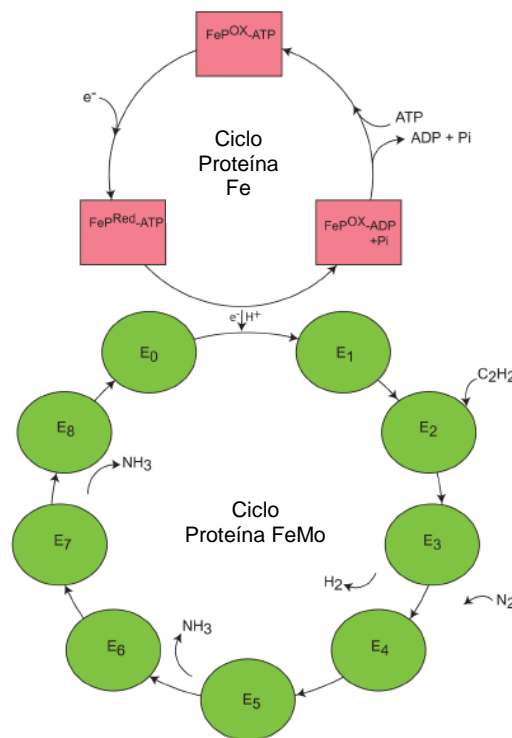


FIGURA 4 - CICLOS CATALÍTICOS DAS PROTEÍNAS Fe E FeMo

Fonte: Seefeldt *et al.* (2009)

Nota: O ciclo superior representa a proteína Fe (FeP), onde pode-se observar os três estados adquiridos por ela: reduzido e ligado a ATP, oxidado e ligado a ADP e oxidado e ligado a ATP. A proteína Fe reduzida e ligada a ATP transfere elétron para o ciclo inferior, que corresponde à proteína FeMo. Nele estão mostrados nove estados de oxidação do cofator FeMo (E₀), sucessivamente reduzido a cada elétron. O N₂ fornecido como substrato está mostrado ligando-se ao E₄, acompanhado do deslocamento de H₂, e após a transferência de seis elétrons, a primeira molécula de NH₃ é liberada e, então, após mais dois elétrons, é liberada a segunda molécula de NH₃. O outro substrato mostrado é o acetileno, ligando-se ao E₂ e após a transferência de dois elétrons, etileno é liberado.

Como foi mostrado nas FIGURAS 3 e 4, ocorre a hidrólise de 16 moléculas de ATP por molécula de N₂ reduzida.

Devido a sua baixa especificidade, a nitrogenase é capaz de reduzir diversos outros substratos que contenham dupla ou tripla ligação, como ácido cianídrico, ácido hidrazóico, óxido nitroso (IGARASHI; SEEFELDT, 2003). O substrato mais utilizado para avaliar a atividade da nitrogenase *in vivo* e *in vitro* é o acetileno (C₂H₂) que é reduzido a etileno (C₂H₄). Quando nenhum outro substrato está presente, a nitrogenase é capaz de reduzir os prótons presentes na solução a H₂ (BARNEY *et al.*, 2004; BOTHE; FERGUSON; NEWTON, 2006).

Devido à presença dos núcleos metálicos que funcionam como centros redox doadores de elétrons, a nitrogenase é extremamente sensível ao oxigênio (HOWARD; REES, 1996).

2.4 BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO

A fixação biológica de nitrogênio é conhecida desde 1888 quando Hellriegel e Wilfarth demonstraram que legumes poderiam utilizar nitrogênio atmosférico para crescimento e que este processo dependia da presença de bactéria nos nódulos das raízes. As bactérias capazes de fixar N_2 são chamadas de bactérias diazotróficas ou diazotrófos. Somente em 1966 e 1967, a enzima que catalisa este processo, a nitrogenase, foi caracterizada em *Azotobacter vinelandii* e *Clostridium pasteurianum* (BULEN; LECOMTE, 1966; MORTENSON; MORRIS; JENG, 1967). Embora a fixação de nitrogênio não seja encontrada em eucariotos, vários grupos filogenéticos de procariotos, conseguem metabolizar o N_2 (DIXON; KAHN, 2004).

Os diazotrófos podem ser de vida livre ou viver em associações. São classificados em dois grupos de acordo com sua interação com parceiros vegetais. Os do grupo 1 ou associativos contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma simbiose e são capazes de fixar N_2 independente de um hospedeiro. Os do grupo 2 ou diazotrófos simbióticos dependem do estabelecimento de uma interação simbiótica com o hospedeiro vegetal. Nesta simbiose, a planta fornece fonte de carbono e um ambiente protegido, enquanto a bactéria excreta nitrogênio fixado pelo vegetal (BURRIS, 1991; VINHAL-FREITAS; RODRIGUES, 2010).

Dentre as bactérias do grupo 1 que fixam nitrogênio e promovem o crescimento vegetal, as dos gêneros *Azospirillum*, *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* são as mais estudadas (BALDANI; BALDANI, 2005). Outros exemplos de bactérias fixadoras de nitrogênio englobam os gêneros *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Burkholderia* e *Azoarcus*, os quais são capazes de associar-se a uma grande variedade de gramíneas, e são capazes de aumentar a produtividade, possibilitando economia de fertilizantes nitrogenados na agricultura (BALDANI *et al.*, 1992; DONG *et al.*, 1994; GILLIS *et al.*, 1989, 1995; RENNIE *et al.*, 1982).

2.5 O GÊNERO *Azospirillum*

O gênero bacteriano *Azospirillum* contém espécies diazotróficas. *Azospirillum* spp. são bactérias microaerófilas, gram-negativas, curvas, móveis, isoladas de várias

origens geográficas, pertencentes à classe α das proteobactérias (DÖBEREINER, 1991; PEDROSA, 1988). Algumas espécies de *Azospirillum* spp. têm um grande potencial de uso como biofertilizante, face à sua ampla distribuição geográfica, sua eficiência na fixação de nitrogênio *in vitro* e capacidade que possuem de se associar a raízes de ampla faixa hospedeira (BASHAN; HOLGUIN, 1997; PEDROSA, 1987). Esses microrganismos são denominados diazotrófos endofíticos facultativos uma vez que colonizam tanto o interior quanto a superfície das raízes e são também encontrados em vida livre (DÖBEREINER, 1991). Em muitos casos a inoculação destas bactérias reduziu a utilização de fertilizantes químicos, principalmente os nitrogenados, de 20 a 50% (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004). Esses microrganismos são, também, capazes de produzir substâncias promotoras de crescimento vegetal, como fitormônios, auxinas, citocininas e giberelinas (BARBIERI; GALLI, 1993; FAGES, 1994; OKON; ALBRECHT; BURRIS, 1976).

Azospirillum brasilense, objeto desse estudo, é uma bactéria encontrada associada a várias espécies de importância agroeconômica. A fixação de nitrogênio em *A. brasilense* ocorre sob condições específicas de concentração de oxigênio, temperatura, fonte de carbono e de energia. *A. brasilense* é capaz de fixar nitrogênio sob condições de microaerofilia e baixos níveis de nitrogênio (DOBEREINER; DAY, 1976). Requer O_2 como um aceptor de elétrons para produzir energia para o crescimento e a fixação do nitrogênio (ZHANG *et al.*, 1993). A pressão parcial de O_2 ideal para que ocorra a fixação de nitrogênio está na faixa de 0,2 kPa de oxigênio dissolvido (HARTMANN; BURRIS, 1987).

2.6 PROTEÍNAS DA FAMÍLIA PII

A assimilação e incorporação de nitrogênio têm que ser reguladas para evitar perda desnecessária de energia. O conhecimento dos sistemas de controle do metabolismo de nitrogênio varia de organismo para organismo. As proteínas de transdução de sinal da família PII desempenham um papel importante na coordenação da regulação de processos metabólicos (HUERGO, 2006; MOURE, 2012).

Representantes desta família são encontrados em todos os domínios: Bacteria, Archaea fixadoras de nitrogênio e nos cloroplastos dos eucariotos fototróficos (algas vermelhas e plantas) (FORCHHAMMER, 2008; HSIEH *et al.*, 1998).

As proteínas PII constituem uma família de proteínas altamente conservadas que atuam na transdução de sinais de nitrogênio, carbono e energia intracelular, através das concentrações de três sinais metabólicos: 2-oxoglutarato (2-OG), glutamina e ATP/ADP (ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001), desempenhando um papel importante na coordenação da regulação de processos metabólicos centrais (HUERGO et al., 2006a).

De acordo com a nomenclatura atual das PII, elas podem ser classificadas em três subgrupos: os produtos dos genes do tipo *glnB*, *glnK* e *nifl*. Em geral, a organização estrutural dos operons contendo os genes *glnB* e *glnK* é bastante conservada. O gene *glnB* encontra-se ligado a *glnA* (codifica GS) ou *nadE* (codifica NAD sintetase). Em diversos organismos, exceto em *A. brasilense* e *Rhodospirillum rubrum*, o gene *glnK* encontra-se ligado ao gene *amtB*, que codifica para o transportador de membrana AmtB (ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001; DE ZAMAROCZY, 1998; PERLOVA et al., 2003). Em *A. brasilense*, o gene *glnZ* é monocistrônico (DE ZAMAROCZY, 1998). E *nifl* encontra-se associado a genes *nifH*, *nifD* e *nifK* (MOURE, 2012).

Um subgrupo diferente de PII é formado pelas proteínas Nifl1 e Nifl2, que são encontradas em arqueias metanogênicas e em bactérias estritamente anaeróbicas. Os genes *nifl* estão localizados na vizinhança de genes estruturais da nitrogenase (SANT'ANNA et al., 2009). Funcionalmente, os genes *nifl* participam do sistema de desligamento da enzima nitrogenase em função dos níveis de nitrogênio fixado, sendo que a proteína Nifl interage fisicamente com a nitrogenase deste grupo bacteriano (DODSWORTH; LEIGH, 2006; LEIGH; DODSWORTH, 2007). No entanto, nenhuma estrutura de proteínas Nifl foi resolvida.

2.6.1 Estrutura das proteínas do tipo PII

As proteínas PII, GlnB e GlnK, sendo a última denominada GlnZ somente em *A. brasilense*, apresentam alta similaridade estrutural, sendo compactas, homotrímeras cilíndricas e pequenas (~ 112 aminoácidos) com massa molecular de 12-13 kDa por monômero. De uma forma geral, sabe-se que sinais a partir do carbono, nitrogênio e estado energético causam alterações conformacionais pela ligação de efetores e modificação pós-traducional das proteínas PII. Dependendo destes estados de conformação e modificação, as PII interagem com diferentes proteínas-alvo, como

ativadores transcricionais, enzimas e transportadores de membrana que em sua maioria realizam ou regulam as reações de assimilação de nitrogênio (FORCHHAMMER, 2008).

Apresentam três sítios de ligação a efetores localizados nas fendas laterais entre as subunidades dos trímeros. Cada subunidade apresenta uma alça exposta ao solvente, denominado alça T, as quais são significativamente conservadas em sequência, porém bastante flexíveis e adotando diversas conformações nos cristais. Esta alça é vital para a interação das PII com diversos alvos (FORCHHAMMER, 2008; TRUAN *et al.*, 2010). Possivelmente essa alça forma uma estrutura estável apenas quando interagindo com os receptores celulares (SAKAI *et al.*, 2005). Além da alça T, também existem outras duas alças menores, chamadas de alças B e C, que contribuem para a formação do sítio de ligação a nucleotídeos onde ADP ou ATP podem se ligar de forma competitiva (CHEAH *et al.*, 1994; TRUAN *et al.*, 2010; XU *et al.*, 1998). A estrutura de uma PII típica se encontra ilustrada na FIGURA 5.

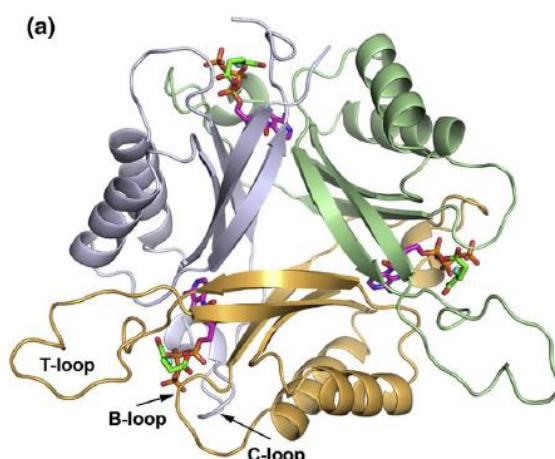


FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO EM VISTA SUPERIOR DA ESTRUTURA DE GlnZ DE *A. brasilense*

Fonte: Truan *et al.* (2010)

Nota: O trímero com ATP (rosa), 2-OG (verde) e Mg^{2+} (azul). Alça T (resíduos 37–55), alça B (resíduos 82–88), e alça C (resíduos 102–105) estão indicados por setas. Apresentam fendas laterais entre as subunidades, onde duas alças menores (B e C) contribuem para a formação do sítio de ligação a nucleotídeos, onde ADP ou ATP podem se ligar de forma competitiva.

2.6.2 Modificação pós-traducional das proteínas PII

Uma característica das proteínas tipo PII em proteobactérias é a capacidade de sofrer modificação pós-traducional reversível por uridilação no resíduo tirosina 51 localizado na alça T. Esta modificação é realizada pela enzima bifuncional GlnD

(uridililtransferase/removedora de uridilil - UTase/UR) e varia de acordo com os níveis de nitrogênio intracelular, ambas as formas de PII (livre ou uridililada) podem interagir com diversas proteínas receptoras modulando suas atividades (LEIGH; DODSWORTH, 2007).

O mecanismo de uridililação foi melhor estudado em *E. coli*. Atkinson *et al.*, (1994) propuseram um mecanismo sequencial ordenado, onde a enzima GlnD liga primeiro a proteína GlnB e em seguida o segundo substrato, UTP. Após a reação são liberados os produtos PPi e GlnB-UMP, nesta ordem. A atividade de transferência ou remoção de grupo uridilil é regulada, por sua vez, pelos níveis de nitrogênio/glutamina celulares. Observou-se que a reação de uridililação da proteína GlnB é não-cooperativa, uma vez que as formas mono e di-uridililadas foram encontradas quando as reações foram analisadas ao longo do tempo, e ao final da reação, a PII estava completamente uridililada.

Em condições limitantes de nitrogênio a concentração de glutamina celular é baixa e a atividade de uridililtransferase é estimulada. Nesta condição, GlnD catalisa a adição de um grupamento uridilil ao resíduo de Tyr51 da PII, sinalizando o início da cascata do sistema Ntr para a fixação de nitrogênio (JIANG; PELISKA; NINFA, 1998b; LEIGH; DODSWORTH, 2007; NINFA; JIANG, 2005). Já a alta concentração de glutamina ativa a função UR de GlnD, removendo os grupamentos uridilil. A uridililação de PII depende da presença ATP e 2-oxoglutarato em *E. coli*, *A. brasilense* e *H. seropedicae*, entre outros (ARAÚJO *et al.*, 2008; BONATTO *et al.*, 2007; KAMBEROV; ATKINSON; NINFA, 1995). As PII uridililadas não conseguem se ligar à proteína NtrB, que na forma livre catalisa a fosforilação da proteína NtrC, ativando-a (FIGURA 6).

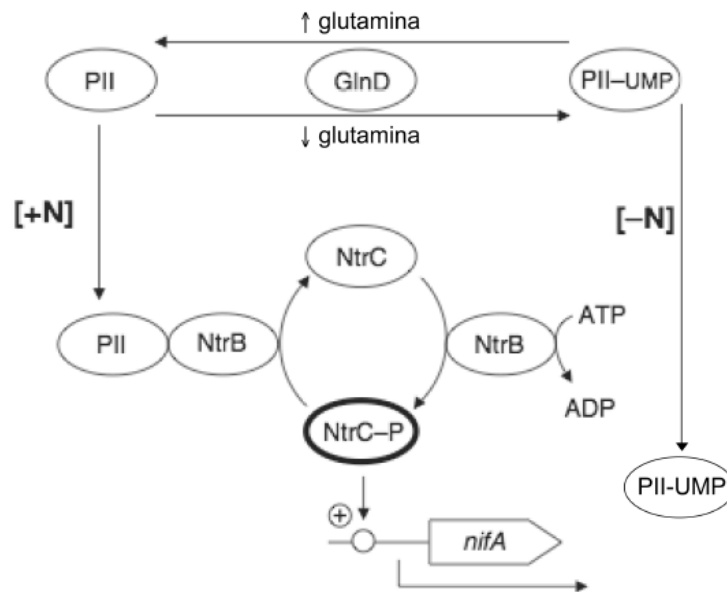


FIGURA 6 – MODELO DA REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DE *nifA* PELA PII EM RESPOSTA AO NÍVEL DE NITROGÊNIO FIXADO

Fonte: Moure (2012).

Nota: Em condições de excesso de nitrogênio a concentração de glutamina intracelular é alta, a glutamina se liga à enzima GlnD favorecendo sua atividade de enzima removedora de uridilil (UR), como consequência GlnB e GlnK são desuridililadas. GlnB e GlnK desuridililadas interagem com NtrB estimulando a desfosforilação e, consequentemente, inativação da proteína NtrC. GlnB e GlnK desuridililadas também interagem com ATase estimulando a inativação da GS por adenililação. Em condições de limitação de nitrogênio os níveis de glutamina intracelular são baixos. Nestas condições GlnD atua como uridililtransferase (UTase) promovendo a uridililação de GlnB e GlnK. As formas uridililadas de GlnB e GlnK não são capazes de interagir e promover a atividade fosfatase de NtrB. Nestas condições NtrB fosforila e, consequentemente, ativa a proteína NtrC. GlnB e GlnK uridililadas interagem com a enzima ATase promovendo a desadenililação e ativação da GS.

Em *A. brasilense* *glnD* também parece ser monocistônico e de expressão relativamente alta, mesmo na presença de amônio (VAN DOMMELEN *et al.*, 2002).

Embora não tenham sido encontrados sítios de ligação para NtrC a montante do gene *glnD*, a expressão de *glnD* aumenta na ausência de nitrogênio, sugerindo ser dependente do sistema regulação de nitrogênio (Ntr) em *A. brasilense* (VAN DOMMELEN *et al.*, 2002).

As proteínas do tipo PII, em geral, podem ser encontradas como trímeros livre, mono, di ou tri-uridililados (BONATTO *et al.*, 2007) e sua modificação covalente é importante para direcionar sua interação com proteínas alvo, como DraT, DraG, AmtB, NtrB e NifA (HUERGO *et al.*, 2006a, 2007, 2009; VAN DOMMELEN *et al.*, 2002; ZHU *et al.*, 2006).

Alguns estudos indicam que o trímero de GlnB não precisa estar completamente uridililado para sinalizar os níveis de nitrogênio para suas proteínas alvo (JIANG; ZUCKER; NINFA, 1997).

A uridililação das proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense* foi extensamente estudada (ARAÚJO *et al.*, 2008). Quando as proteínas PII de *A. brasilense* são uridililadas por GlnD deste organismo, a uridililação de GlnZ é mais lenta quando comparada à GlnB e sempre é parcial, mesmo após uma hora de incubação na presença de 100 nmol/L de GlnD. Nas mesmas condições experimentais, a uridililação total de GlnB ocorreu após 30 minutos de reação (ARAÚJO *et al.*, 2008). Quatro bandas podem ser resolvidas em um gel de eletroforese nativo do produto de uridililação parcial da proteína PII. Estas bandas correspondem ao trímero livre, e as formas mono, di e tri-uridililadas. O acréscimo de um resíduo UMP, carregado, leva a um aumento de migração do trímero no gel nativo (FIGURA 7) (FORCHHAMMER; MARSAC, 1994). Esse perfil foi evidenciado na uridililação de GlnZ. Entretanto, ele não foi observado na uridililação parcial de GlnB de *A. brasilense*. Nesta proteína somente foram evidenciadas a presença de duas bandas (ARAÚJO *et al.*, 2008; HUERGO *et al.*, 2006b). Os autores sugeriram, então, que a uridililação de GlnB ocorreria de forma cooperativa, como em *E. coli*, de forma que a adição de um primeiro grupamento UMP levasse à rápida adição dos outros dois grupamentos, não podendo serem identificadas pelo método empregado as formas mono e diuridililadas (ARAÚJO *et al.*, 2008).

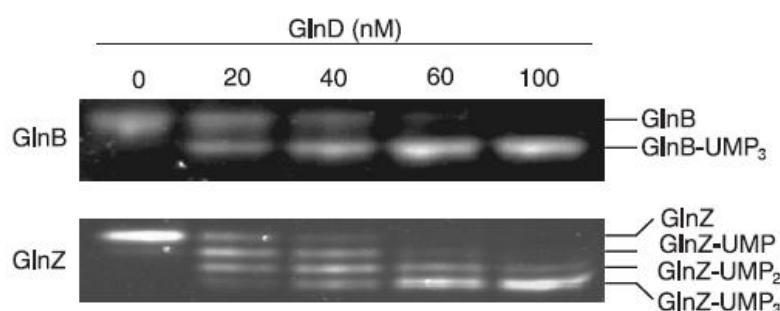


FIGURA 7 – PERFIL DE URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB e GlnZ

Fonte: Araújo *et al.* (2008)

A diferença na taxa de uridililação e desuridililação entre as proteínas do tipo PII de *A. brasilense* pode ser importante para a função dessas proteínas.

Embora a estrutura das PII seja muito similar em diferentes classes de organismos, em PII de cianobactérias este mecanismo de regulação por uridililação

não ocorre. Apesar do resíduo de Tyr-51 estar presente na GlnB da cianobactéria *Synechococcus* sp. estirpe PCC6803, ele não é uridililado provavelmente pela ausência de um homólogo *glnD* (ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001). A modificação covalente nestes organismos ocorre por fosforilação de um resíduo de Ser49 que também está presente na volta T. Assim como ocorre em Proteobacteria, as PII de cianobactérias são modificadas em condições de baixo nitrogênio. A desfosforilação é catalisada por uma proteína fosfatase MM (dependente de Mg^{2+} e Mn^{2+}) (FORCHHAMMER, 2004, 2008).

2.6.3 Ligação de moléculas efetoras às proteínas PII

Além da regulação por modificação covalente de PII, estas proteínas também são reguladas alostericamente pela ligação de efetores como ATP, ADP e 2-oxoglutarato (2-OG). Cada monômero de PII possui um sítio de ligação a nucleotídeo e um sítio de ligação a 2-OG (CONROY *et al.*, 2007; TRUAN *et al.*, 2010). O ATP e ADP ligam competitivamente no mesmo sítio (TRUAN *et al.*, 2010). Com relação ao sítio específico de ligação a 2-OG, estudos cristalográficos de GlnK de *Methanocaldococcus jannaschii* complexado a ATP e 2-OG podem explicar que a ligação aos efetores afeta a interação com os seus alvos porque a ligação de Mg-ATP faz com que a alça T assuma uma formação compacta que, em troca, cria um sítio de ligação para 2-OG na base desta alça. Isso explicaria por que a ligação de 2-OG parece ser dependente de ATP em muitos sistemas.

O efeito dos ligantes ATP e 2-OG sobre a alça T seria o responsável pela modulação da atividade dos receptores celulares (YILDIZ *et al.*, 2007). Segundo Truan *et al.* (2010), a conformação de GlnZ quando ligado MgATP e suas interações com a proteína, com exceção daquelas com os resíduos da alça T, são muito semelhantes às observadas em *Methanococcus jannaschii*. No entanto, o sítio de 2-OG proposto não pode ser generalizado para todas as PII, pois mutações nessa parte da alça não afetaram a ligação de 2-OG em GlnB de *Escherichia coli* (JIANG; ZUCKER; NINFA, 1997; FORCHHAMMER, 2008). O 2-OG é o responsável por direcionar a ocupação por ATP ou ADP, pois como ATP e 2OG ligam-se a PII de forma sinérgica, e ADP e 2OG de forma não sinérgica, ADP e 2OG atuam de forma antagonista na regulação da atividade dos receptores na presença de ATP. Alta concentração celular de 2-OG favorece a ocupação de ATP e esta condição é pré-requisito para a uridililação de GlnZ e GlnK (BONATTO *et al.*, 2012; GERHARDT, 2012).

A ligação da primeira molécula de 2OG inibe a ligação das próximas duas moléculas. Essa cooperação negativa é superada em concentrações correspondentes aos níveis mais altos da faixa fisiológica de 2OG, que ocorrem quando há falta de nitrogênio celular. Enquanto que PII ligada a uma molécula de 2OG é efetiva na ativação de ATase e NtrB em sistemas reconstituídos *in vitro*, PII ligada a 2 ou 3 moléculas teve tais atividades reduzidas ou abolidas (JIANG; NINFA, 2009; JIANG; PELISKA; NINFA, 1998a; KAMBEROV; ATKINSON; NINFA, 1995). Em experimentos de reconstituição dos ciclos de ativação de ATase e NtrB de *E. coli* por PII *in vitro*, foi observado que essas funções são essencialmente influenciadas pela presença de ADP.

Um único trímero de PII pode apresentar seus três sítios ocupados por diferentes ligantes. Assim surgiu a hipótese de que essas proteínas poderiam sensoriar o estado energético da célula respondendo à razão ATP / ADP *in vitro* (FOKINA; HERRMANN; FORCHHAMMER, 2011; JIANG; NINFA, 2009), evidenciando assim, a importância da estrutura trimérica de PII, assim como da comunicação entre as subunidades. Isso explica a conservação da estrutura trimérica mesmo quando a interação de apenas um monômero com o receptor seja suficiente para a ativação das respostas (JIANG; NINFA, 2007; 2009).

Dados de dosagem *in vivo* desses metabólitos em *E. coli* revelaram que 2-OG varia bem mais que ADP ou ATP após choque de amônio em células crescidas em condição limitante de nitrogênio. Apesar disto, a proporção ATP / ADP variou bastante (RADCHENKO; MERRICK, 2011). Os níveis de 2-OG tem potencial de sinalizar suficiência de carbono celular, além de deficiência de nitrogênio. Assim, surgiu a hipótese de que proteínas PII podem sensoriar a relação C/N celular, integrando um sinal de nitrogênio (glutamina e 2-OG), com um sinal de carbono (2-OG) (GERHARDT, 2012; NINFA *et al.*, 2000; NINFA; JIANG, 2005).

Porém, alguns estudos *in vivo* realizados em *E. coli*, mostraram que todos os três sítios de nucleotídeos possuíam moléculas de ATP ligadas em qualquer condição fisiológica (JIANG; PELISKA; NINFA, 1998a; MASEPOHL; FORCHHAMMER, 2007). Isso levou à sugestão de que os níveis de ATP não possuem um papel regulatório *in vivo* (JIANG; PELISKA; NINFA, 1998b; KAMBEROV; ATKINSON; NINFA, 1995).

Tanto o status de uridililação quanto a ligação de efetores em PII alteram a conformação da volta T e consequentemente a interação das PII com suas proteínas-

alvo. Em muitos modelos estruturais de PII complexadas a proteínas-alvo, a volta T tem se mostrado fundamental nestas interações (HUERGO *et al.*, 2012). A única exceção é o complexo DraG-GlnZ, onde os resíduos de aminoácidos da volta T não participam da interação com DraG, expandindo ainda mais a variabilidade de interações proteína-proteína que as PII realizam (RAJENDRAN *et al.*, 2011).

2.6.4 Proteínas PII de *A. brasilense*

O gene *glnB* de *A. brasilense* foi identificado por De Zamaroczy e colaboradores (1990) e codifica para a proteína GlnB. Esta proteína é sintetizada em altos níveis sob condições limitantes de nitrogênio e em baixos níveis sob condições de excesso de nitrogênio ((DE ZAMAROCZY; DELORME; ELMERICH, 1990; DE ZAMAROCZY; PAQUELIN; ELMERICH, 1993; HUERGO *et al.*, 2006b).

Em 1996, também De Zamaroczy e colaboradores descreveram a identificação de uma proteína com 67% de identidade com a GlnB de *A. brasilense*, denominada de GlnZ. Diferentemente do gene *glnK* em vários organismos, *glnZ* não é co-transcrito com *amtB* em *A. brasilense* (HUERGO *et al.*, 2007). Por isso, apesar de ser do tipo GlnK, a proteína correspondente foi chamada de GlnZ (DE ZAMAROCZY, 1998; DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996).

A expressão de *glnZ* em *A. brasilense* é monocistrônica e controlada pela proteína NtrC, sendo aumentada em condições de limitação de nitrogênio (DE ZAMAROCZY, 1998). Estudos evidenciaram o papel das proteínas GlnB e GlnZ no controle do sistema Ntr. No mutante *glnB* a expressão de *glnZ* não é regulada por nitrogênio, indicando que GlnB é necessária para controle das proteínas NtrB e NtrC. No mutante *glnZ* a expressão de *glnB* não é alterada em comparação com a estirpe selvagem, sugerindo que GlnZ não participa no controle da atividade das proteínas NtrB e NtrC (DE ZAMAROCZY, 1998).

Apesar da alta similaridade entre as proteínas PII de *A. brasilense*, GlnB e GlnZ, elas apresentam diferentes funções. Em *A. brasilense*, GlnB está envolvida com a ativação da proteína NifA. Neste organismo a proteína GlnB-UMP é necessária para a atividade da proteína NifA, a ativadora de transcrição dos genes *nif* (ARSENE; KAMINSKI; ELMERICH, 1996; DE ZAMAROCZY; PAQUELIN; ELMERICH, 1993; VAN DOMMELEN *et al.*, 2002). Já GlnZ não tem a mesma função de GlnB para a regulação de NifA, uma vez que o mutante *glnZ* de *A. brasilense* foi capaz de fixar nitrogênio como observado para a estirpe selvagem. Outro fenótipo descrito para o

mutante *glnB* é uma redução na motilidade celular quando cultivado em meio semi-sólido de forma independente da fonte de nitrogênio utilizada. Como o mutante apresenta o mesmo perfil de flagelos observado na estirpe selvagem, foi sugerido que a proteína GlnB tenha uma função no metabolismo energético celular (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996).

GlnZ e GlnB estão relacionadas com a regulação pós-traducional da nitrogenase em resposta a amônia (HUERGO *et al.*, 2005, 2007; KLASSEN *et al.*, 2005), sendo que GlnB sinaliza rápido aumento na concentração de amônio, enquanto GlnZ é principalmente responsável por sinalizar o retorno a condições de depleção de amônio. Embora GlnZ não seja essencial para a regulação da nitrogenase induzida por anaerobiose (KLASSEN *et al.*, 2005). E tanto a proteína GlnB quanto GlnZ de *A. brasilense* tem a capacidade de associar-se à membrana interna de forma dependente de amônio e da proteína AmtB, a qual será considerada posteriormente (COUTTS *et al.*, 2002; HUERGO *et al.*, 2006a)

A interação de proteínas da família PII com a membrana de forma dependente da proteína AmtB foi observada também em *Corynebacterium glutamicum*, *R. rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Bacillus subtilis*, *Methanococcus jannaschii* e *Herbaspirillum seropedice*, *Archaeoglobus fulgidus*, assim como também em Firmibacterias, Actinomicetos e γ -proteobacteria (DETSCH; STÜLKE, 2003; TRUAN *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2006; COUTTS *et al.*, 2002; HUERGO *et al.*, 2012; YILDIZ *et al.*, 2007; REES *et al.*, 2005), sugerindo que a interação entre as proteínas PII e AmtB seja um processo universal em procariotos (RADCHENKO; MERRICK, 2011). Dados cristalográficos do complexo AmtB e GlnK de *E. coli* confirmam que esta interação depende exclusivamente da alça T de GlnK (FIGURA 8).

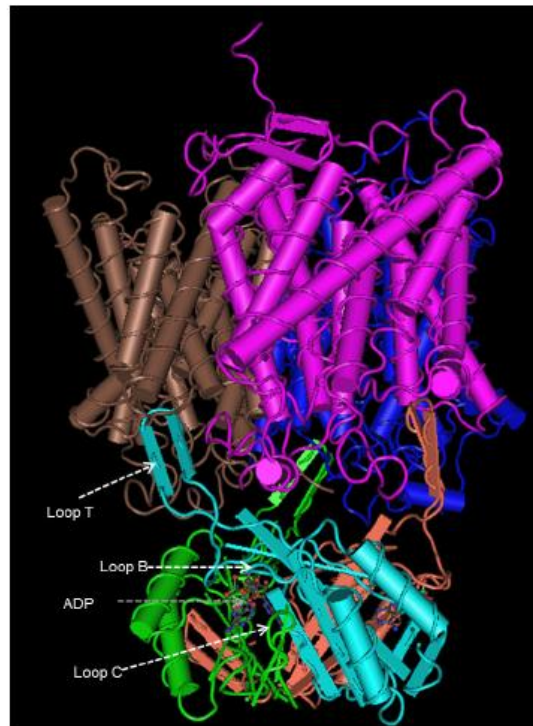


FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO DO COMPLEXO AmtB-GlnK DE *E. coli*.

Fonte: Conroy *et al.* (2007)

Nota: As cadeias em marrom, rosa e azul correspondem a monômeros de AmtB (trímero). As cadeias verde, laranja e azul claro correspondem a monômeros de GlnK (trímero). As linhas pontilhadas em branco indicam os *loops* de GlnK e o ADP ligado na fenda lateral do trímero.

2.7 CAPTAÇÃO DE AMÔNIO

Para que o amônio extracelular seja metabolizado ele precisa atravessar a membrana celular. A forma não protonada NH_3 (amônia) pode entrar na célula por difusão simples pela membrana lipídica, processo que pode ocorrer em ambas direções. Esta difusão não é controlada e é muito lenta em pH baixo ou neutro. Em condições limitantes de amônio extracelular, faz-se necessária a presença de proteínas transportadoras (KLEINER, 1985).

2.7.1 Transportadores de amônio

Em condições de baixo nitrogênio, *Azospirillum brasilense* apresenta um sistema capaz de captar traços de íons amônio (NH_4^+), de forma dependente de energia (HARTMANN; KLEINER, 1982).

A proteína AmtB pertence a família de transportadores de amônio Amt/Mep/Rh. Em *E. coli* e muitos outros procariotos, o gene que codifica AmtB (*amtB*)

está em um *operon* junto com o gene que codifica para a proteína PII GlnK (*glnK*) (THOMAS; COUTTS; MERRICK, 2000). Em *A. brasilense*, o gene *amtB* é expresso de forma monocistônica, e tem sua expressão aumentada em condições de limitação de nitrogênio, de forma dependente do fator σ^{54} da RNA polimerase e da proteína NtrC (VAN DOMMELEN *et al.*, 1998). A proteína AmtB de *E. coli* é um homotrímero com 11 hélices transmembranas que formam um canal hidrofóbico pelo qual as moléculas de amônia passam (FIGURA 9a) (KHADEMI *et al.*, 2004).

Modelos estruturais tridimensionais da proteína AmtB de *E. coli*, ligada ou não à amônio e a metilamônio, indicam que a proteína não sofre mudanças conformacionais na presença dos seus substratos, sugerindo que a proteína AmtB forma um canal para a condução de NH_3 (KHADEMI *et al.*, 2004; ZHENG *et al.*, 2004). O amônio existe como uma mistura de duas espécies (NH_3 e NH_4^+), sendo que a concentração de cada uma depende do pH do meio. Como o pKa é de 9,26, a maior parte do amônio encontra-se na forma NH_4^+ em pH neutro.

Vários são os mecanismos propostos para o transporte empregado pelos membros da família Amt. O transportador AmtB, apresenta grande afinidade por amônio (HARTMANN; KLEINER, 1982). Então, a grande maioria dos trabalhos sugere que o NH_4^+ se liga a entrada do canal da proteína Amt, sendo então desprotonado. Após a passagem de NH_3 por este canal hidrofóbico, a amônia atinge o meio intracelular sendo novamente protonada (FIGURA 9b) (JAVELLE *et al.*, 2005; SOUPENE *et al.*, 1998).

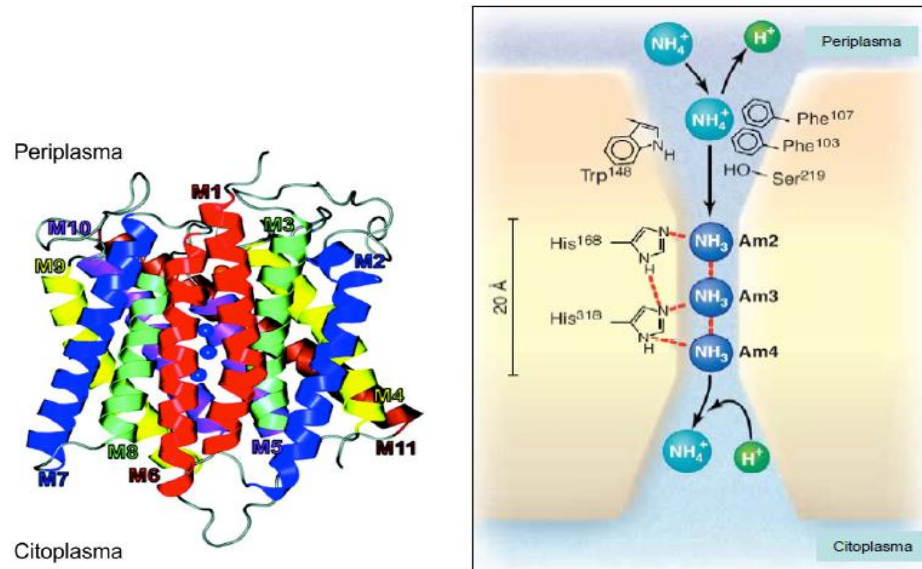


FIGURA 9 – (A) MODELO ESTRUTURAL E (B) DE TRANSPORTE DE NH₃ PROPOSTO PARA AmtB de *E. coli*.

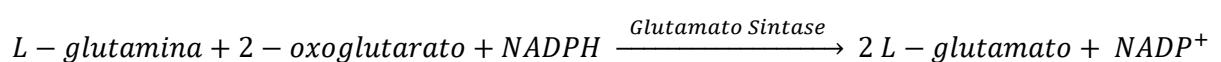
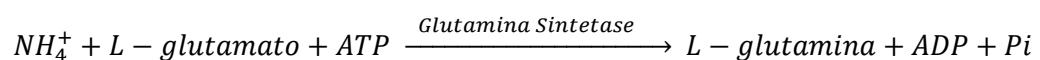
Fonte: Khademi *et al.* (2004).

Nota: As 11 hélices transmembrana são representadas como M1 a M11.

2.8 ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIO

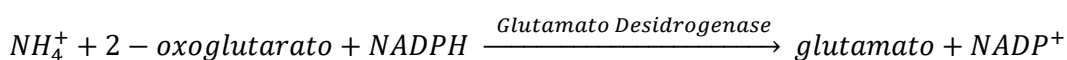
Quando o crescimento de um microrganismo é limitado pela fonte de nitrogênio, uma resposta regulatória promove o aumento da produção dos componentes celulares do mecanismo de assimilação deste nutriente, buscando o uso de fontes alternativas de nitrogênio.

O amônio obtido pelo processo de fixação de nitrogênio ou captado do meio externo é utilizado na síntese de glutamina e glutamato, os quais servem como doadores de nitrogênio para as reações biossintéticas (ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001). A assimilação de amônio por microrganismos pode ocorrer por duas vias. A via 1 envolve a ação sequencial das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase, segundo as reações a seguir (GOGAT) (MERRICK; EDWARDS, 1995):



A glutamato sintase catalisa a aminação redutiva do 2-oxoglutarato, produzindo glutamato, utilizando glutamina como doadora de nitrogênio. A glutamina sintetase catalisa a reação de formação da glutamina a partir de glutamato e NH_4^+ . A síntese e atividade desta enzima é altamente regulada. Produtos finais do metabolismo da glutamina, como a alanina e a glicina, são inibidores alostéricos de GS (MERRICK; EDWARDS, 1995).

A segunda via de assimilação de amônio envolve a enzima glutamato desidrogenase (GDH):



A glutamato desidrogenase catalisa a reação reversível da aminação do 2 - oxoglutarato pela amônia formando glutamato e utilizando as coenzimas NADH ou NADPH. Em microrganismos, a GDH NADH-dependente parece estar envolvida em funções catabólicas enquanto a NADPH-dependente em funções anabólicas (BENDER; MACALUSO; MAGASANIK, 1976).

A primeira via (GS – GOGAT) é a principal responsável pela assimilação de amônio em condições limitantes deste composto, e é a via predominante em *A. brasilense* (FIBACH-PALDI; BURDMAN; OKON, 2012).

A segunda via (GDH) funciona quando a concentração de amônio é alta, pois a GDH possui uma afinidade relativamente baixa para NH_4^+ (MERRICK; EDWARDS, 1995). Em *A. brasilense* a via GS-GOGAT é a via predominante de assimilação de amônio independente da fonte de nitrogênio utilizada para crescimento (WESTBY et al., 1987). A forma comum de GS é uma enzima dodecamérica com subunidades idênticas de aproximadamente 55 kDa, codificada pelo gene *glnA* (MERRICK; EDWARDS, 1995). E além da regulação alostérica, em *A. brasilense*, tem sua atividade controlada por adenililação, que é adição covalente de um grupamento adenilil de um resíduo específico de tirosina, que aumenta ainda mais a sensibilidade da enzima aos inibidores alostéricos (ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001; MAGASANIK, 1993). A proteína GlnB, proteína PII presente em diversos organismos fixadores de nitrogênio, regula a adenililação da proteína glutamina sintetase pela enzima adenililtransferase, ATase (FIGURA 10). Em altos níveis de nitrogênio fixado, a ATase complexa com a GlnB e glutamina e catalisa a adenililação da glutamina

sintetase, inativando-a. Em baixas concentrações de nitrogênio fixado, a glutamina sintetase é ativada por desadenililação também catalisada pela ATase complexada à proteína GlnB-UMP (BROWN; SEGAL; STADTMAN, 1971; JIANG; PELISKA; NINFA, 1998a; NINFA; JIANG, 2005).

Caminhos de assimilação de amônia e regulação da glutamina sintetase em *E. coli* estão representados na FIGURA 10 abaixo.

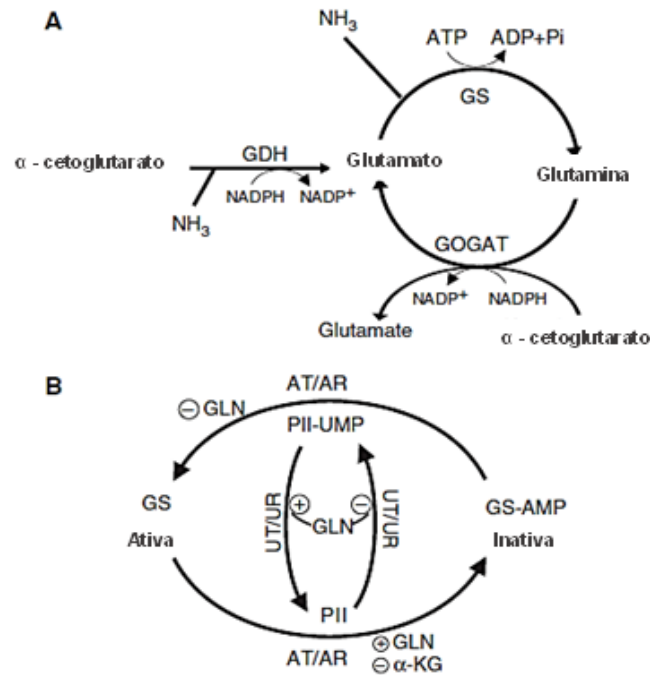


FIGURA 10 – CAMINHOS DE ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIA E REGULAÇÃO DA GLUTAMINA SINTETASE EM *E. coli*.

Fonte: Adaptado de Yuan *et al.*, 2009

Nota: (A) NH_3 pode ser assimilada por meio da glutamato desidrogenase (GDH) ou do ciclo GS / GOGAT. Para cada volta do ciclo GS / GOGAT, uma molécula de amônia é assimilada em glutamato. (B) A atividade da GS é regulada pela enzima bifuncional adenililtransferase / enzima removedora de adenilil (AT / AR), com a adenililação inativando a GS. E a atividade de AT / AR é regulada pela proteína de sinalização PII, a qual é por si mesma modificada covalentemente por GlnD, outra enzima bifuncional com as atividades de uridilil transferase (UT) e removedora de uridilil (UR). A PII não modificada indica a suficiência de nitrogênio e promove a adenililação de GS. A glutamina e o α -cetoglutarato regulam alostericamente AT / AR e UT / UR como mostrado.

2.9 REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DO NITROGÊNIO

2.9.1 Regulação pós-traducional da atividade de nitrogenase por amônio

O sistema de regulação pós-traducional da atividade da nitrogenase foi descoberto pela primeira vez na bactéria fotossintética *Rhodospirillum rubrum*, a partir

da qual foi obtido o conhecimento mais detalhado sobre as proteínas envolvidas. No entanto, estudos do sistema operando na bactéria aeróbia *Azospirillum brasilense* têm contribuído grandemente para uma compreensão mais detalhada.

Em *A. brasilense*, a regulação pós-traducional da nitrogenase ocorre por ADP-ribosilação reversível de NifH e é controlada pela presença de amônia no meio externo e pela diminuição da carga energética ocasionada por anaerobiose. Esse fenômeno, conhecido como desligamento e religamento da nitrogenase envolve as proteínas DraT (dinitrogenaseredutase ADP-ribosiltransferase) e DraG (dinitrogenaseredutaseglicohidrolase) (produtos dos genes *draT* e *draG*, respectivamente) (ZHANG *et al.*, 2001a).

Sob condições incompatíveis com a fixação de nitrogênio, DraG é inativado e DraT torna-se ativo catalisando a transferência de um grupamento ADP-ribosil do NAD⁺ para o resíduo Arg-101 de uma das subunidades de NifH (proteína Fe). Na forma modificada, esta proteína é incapaz de interagir com NifDK (proteína FeMo), impedindo a transferência de elétrons e redução do substrato (MOURE *et al.*, 2013). DraT permanece ativo por um curto período, enquanto DraG permanece inativo todo o tempo em que a célula se encontrar sob o estímulo negativo. Após a exaustão de amônio ou o restabelecimento dos níveis de energia, DraG é, então, reativada para restaurar a atividade da nitrogenase pela remoção de um grupamento ADP-ribosil da NifH (HUERGO *et al.*, 2012). Esse processo está representado na FIGURA 11 abaixo.

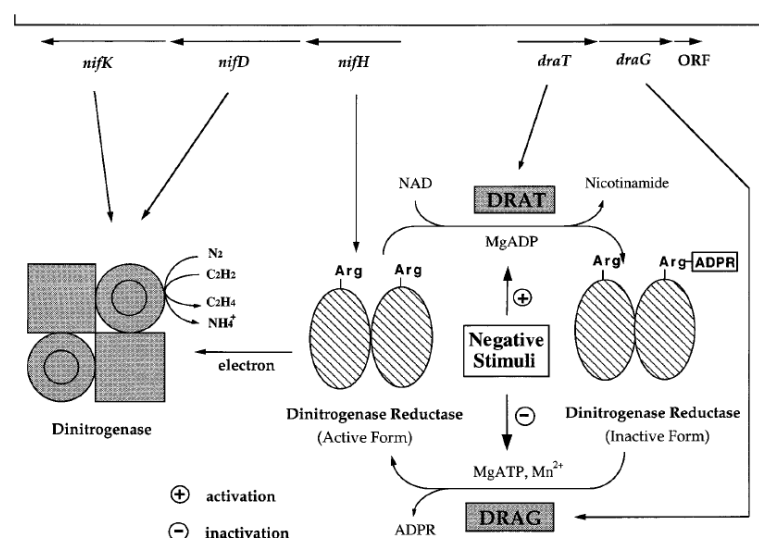


FIGURA 11 – ESQUEMA DA REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA NifH POR ADP-RIBOSILAÇÃO REVERSÍVEL

Fonte: Zhang *et al.* (1997)

A regulação pós-traducional da nitrogenase pode ser seguida pela medição da atividade da mesma utilizando o método de redução de acetileno (FIGURA 12a). A intensidade do efeito de desligamento e religamento varia de acordo com o organismo e com o tipo e quantidade do estímulo negativo. Alguns organismos inativam a nitrogenase ao nível metabólico, tal como mostrado na FIGURA 12, pela adição de um grupamento ADP-ribosil em uma das subunidades de NifH. A ADP-ribosilação pode ser acompanhada pela separação da NifH não-modificada e NifH-ADP-ribosilada (NifH-ADPR) através do Western blot. NifH-ADPR mostra uma taxa de migração mais lenta (FIGURA 12b).

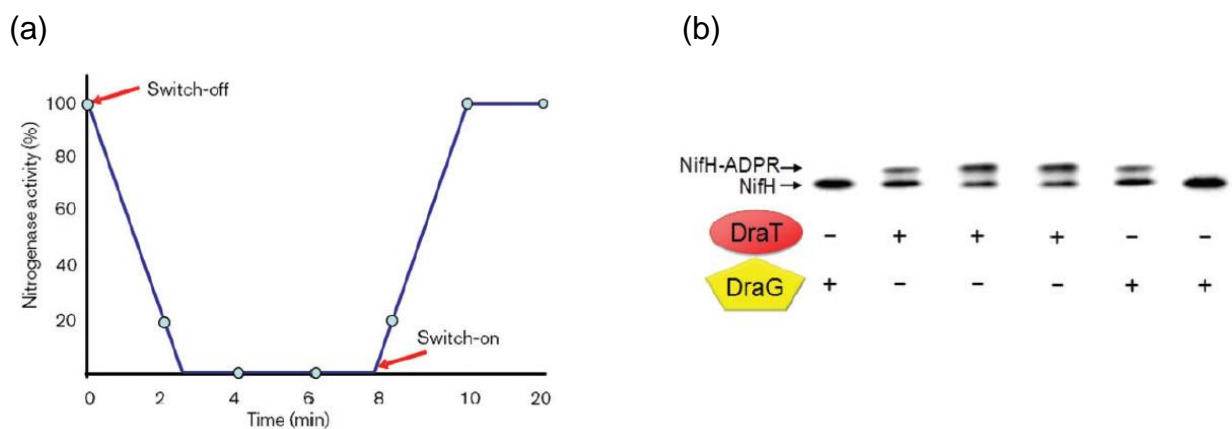


FIGURA 12 – CONTROLE DO DESLIGAMENTO/RELIGAMENTO DA NITROGENASE POR ADP-RIBOSILAÇÃO EM *A. brasilense*.

Fonte: Huergo *et al.*, 2012

Nota: Em (a) as setas marcadas como desligado e ligado indicam os tempos em que o estímulo negativo (amônia) para a nitrogenase foi adicionado ou removido, respectivamente. (b) as atividades de DraT e DraG são sujeitas a regulação oposta durante a desativação de nitrogenase. Enzima ativa (+); enzima inativa (-).

Recentemente, Moure e colaboradores (2015) apresentaram um modelo envolvendo as proteínas PII (GlnB e GlnZ) e AmtB que explica a regulação das enzimas DraT e DraG de *A. brasilense* após adição de NH_4^+ (FIGURA 13). Em condição de fixação de nitrogênio, o nível intracelular de glutamina é baixo e de 2-oxoglutarato é alto. Além disso, a razão ATP/ADP é alta para suportar a atividade da nitrogenase. Nesta condição, as PII, GlnB e GlnZ estão completamente uridililadas e se localizam no citoplasma. Nesta condição, DraG deve estar ativa para que a nitrogenase esteja ativa. Quando os níveis de amônio extracelular aumentam, a concentração de glutamina aumenta por estímulo da atividade da glutamina sintetase. A glutamina é um efector positivo da atividade de desuridililação das proteínas PII. Na presença de ADP, GlnB e GlnZ nas suas formas completamente desuridililadas

permaneceram ligadas a DraT e DraG, respectivamente. Nesta condição a DraT está ativa, catalisando ADP-ribosilação da proteína Fe, inativando a nitrogenase. DraT é inativada pela interação com GlnB. Além disso, nesta condição, a formação do complexo GlnZ-DraG sugere que ele seja sequestrado para a membrana celular, uma vez que existe a formação de um complexo ternário com AmtB (FIGURA 14) (HUERGO *et al.*, 2007; MOURE, 2012; ZHANG *et al.*, 2001b). Zhang e colaboradores (1996), afirmaram que, em *A. brasilense*, existe um segundo mecanismo de controle pós-traducional da nitrogenase independente de DraT e DraG, mas a inibição da nitrogenase não é completa.

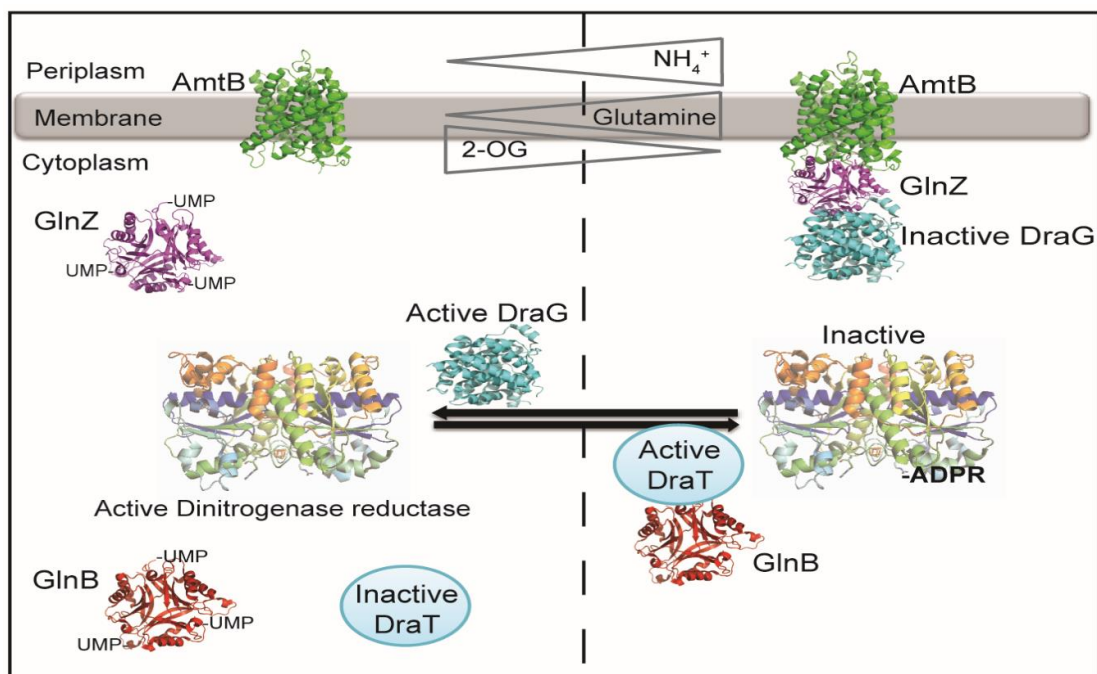


FIGURA 13 – MODELO PARA O ENVOLVIMENTO DAS PROTEÍNAS PII, AmtB, DraT, DraG E EFETORES NA REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE EM *Azospirillum brasilense*.

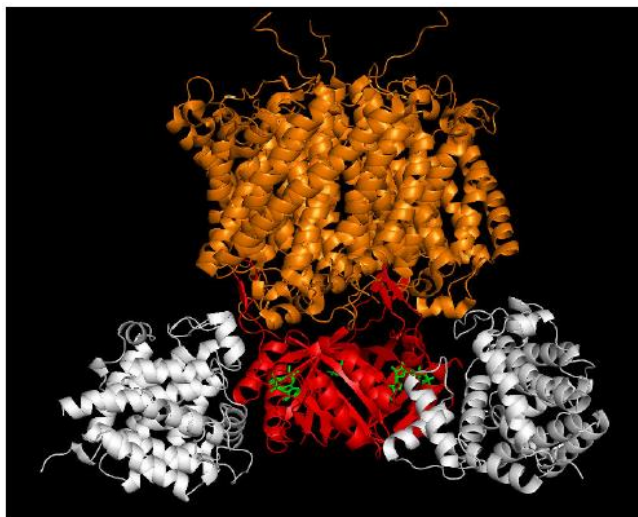


FIGURA 14 – REPRESENTAÇÃO DO COMPLEXO TERNÁRIO AmtB-GlnZ-DraG.

Fonte: Gerhardt, 2012

Nota: Sobreposição AmtB-GlnK (Conroy *et al.*, 2007) de *E. coli* e GlnZ-DraG de *A. brasilense* (Rajendran *et al.*, 2011). Laranja – AmtB, Branco – DraG, Vermelho – ADP-GlnZ.

2.9.2 Regulação pós-traducional da atividade de nitrogenase por depleção de energia

O sistema de regulação da nitrogenase por ADP-ribosilação responde não apenas à presença de amônio, mas também à diminuição da disponibilidade de energia celular, em resposta à anaerobiose, como em *A. brasilense* e *Azoarcus* sp., ou queda de luminosidade, como visto em *R. capsulatus* e *R. rubrum* (HARTMANN; FU; BURRIS, 1986; LOWERY; SAARI; LUDDEN, 1986; MARTIN; REINHOLD-HUREK, 2002).

Em *A. brasilense*, a modificação covalente da proteína Fe por ADP-ribosilação em resposta à anaerobiose também é regulada pelo sistema DraT/DraG. No entanto, muito pouco se sabe sobre o mecanismo de sinalização responsável pela regulação de DraT e DraG em resposta à depleção de energia (LUDDEN; BURRIS, 1976).

Estudos realizados por Klassen e colaboradores (2001; 2005) e Huergo e colaboradores (2006), com mutantes *glnZ* e *glnB*, assim como com mutante *amtB* (ZHANG *et al.*, 1994), em *Azospirillum brasilense*, mostraram que as proteínas que AmtB e PII são necessárias para a regulação das atividades de DraT e DraG em resposta ao amônio, porém, provavelmente, não estão envolvidos na inativação da nitrogenase em resposta a anaerobiose.

Estes resultados sugerem que vias distintas regulam as atividades de DraT e DraG em resposta aos diferentes sinais, porém ainda não está claro onde, e se, tais vias se sobrepõem (NORDLUND; HÖGBOM, 2013).

Em *R. rubrum*, GlnB ou GlnJ é necessária para a ADP-ribosilação de NifH induzida pela escuridão, uma vez que o mutante *glnB* não conseguiu ADP-ribosilar a proteína Fe em resposta tanto ao amônio quanto à escuridão, indicando o envolvimento de diferentes caminhos de sinalização para a depleção de energia nesse organismo (ZHANG *et al.*, 2001b, 2003). Esses dados apoiam a proposta de que a ADP-ribosilação em *R. rubrum* induzida pela escuridão poderia compartilhar pelo menos alguns dos mesmos mecanismos de sinalização que a inativação dependente de amônio (HUERGO *et al.*, 2012)

Estudos sobre o desligamento da atividade da nitrogenase na presença de íons amônio mostraram que a glutamina é o sinal direto para o sistema DraT / DraG. No entanto, enquanto a concentração intracelular de glutamina em *R. rubrum* aumenta rapidamente após o tratamento com NH_4^+ , há pouca alteração em resposta a escuridão (KANEMOTO; LUDDEN, 1987; LI; HU; YOCH, 1987). Hartmann e Burris (1987) também relataram que a associação de glutamina mudou durante o choque de NH_4^+ , mas não durante tratamentos anaeróbicos em *A. brasilense*.

O principal componente da diminuição da carga de energia da célula é a relação ATP/ADP (CHAPMAN; FALL; ATKINSON, 1971; UPCHURCH; MORTENSON, 1980). As enzimas DraT e DraG têm especificidades opostas para NifH ligado a ADP ou ATP: DraT é mais ativo contra a forma ADP-NifH e DraG contra o ATP-NifH (LOWERY; LUDDEN, 1988; SAARI; TRIPLETT; LUDDEN, 1984). Consequentemente, uma diminuição na relação ATP / ADP pode levar à resposta da regulação por depleção de energia. No entanto, as medidas sugerem que as flutuações de ATP / ADP induzidas pela escuridão em *R. Rubrum* são provavelmente insuficientes para explicar a regulação (KANEMOTO; DOWLING; LUDDEN, 1984) e, além disso, uma redução nos níveis de ATP celular não afetou significativamente a regulação da nitrogenase (ZHANG; POHLMANN; ROBERTS, 2009).

Outro candidato para um efector que poderia mediar tanto o desligamento por NH_4^+ quanto o desligamento anaeróbico poderia ser o nível NAD na célula. Como o NAD é o substrato da DraT e a fonte da ADP-ribose para a modificação da NifH. Espera-se que o NAD seja reduzido a NADH em condições anaeróbicas (ZHANG *et*

al., 1994). Também foi relatado que o NAD exógeno pode inibir parcialmente a atividade da nitrogenase em *R. rubrum* (SOLIMAN; NORDLUND, 1992).

Além disso, os mutantes *ntrC* de *A. brasilense* e *R. rubrum* são incapazes de sofrer ADP-ribosilação (PEDROSA; YATES, 1984; ZHANG *et al.*, 1995, 1997), sugerindo que a NtrC pode participar de um circuito de sinalização incluindo DraT / DraG, possivelmente para regular a expressão de uma proteína sinal.

Ensaio realizados com a estirpe BH72 de *Azoarcus sp.* mostraram que a presença de PII, GlnB e GlnK, e AmtB foram necessárias para a regulação da nitrogenase em resposta ao choque de amônio, enquanto que para a resposta à anaerobiose, a presença de GlnK ou GlnB foi necessária, já o AmtB não foi, uma vez que a inibição da nitrogenase ainda ocorreu no duplo mutante (*glnK* e *glnB*), porém não mostra uma modificação de NifH, nesse caso a modificação aparentemente não é um pré-requisito para a inibição (MARTIN; REINHOLD-HUREK, 2002).

Também é sugerido um papel regulador do fluxo de elétrons na inativação da nitrogenase, uma vez que no desligamento anaeróbico, um sinal derivado do estado redox, pode desencadear a modificação da proteína Fe (EGENER *et al.*, 2001).

De acordo com esses resultados Halbleib e colaboradores (2000) mostraram que o estado redox de NifH influencia as respostas ao NH_4^+ via ADP-ribosilação de NifH da estirpe BH72 de *Azoarcus sp.*. O que pode ser considerado como um provável sinal para controle da ativação da nitrogenase em condições de limitação de oxigênio, já que a diminuição dos níveis de oxigênio em uma cultura da cepa BH72 fixando N_2 indica um fluxo reduzido de elétrons para O_2 concomitante com diminuição da fixação de N_2 , o que pode resultar em mudanças no estado redox dos portadores celulares de elétrons (OETJEN; REINHOLD-HUREK, 2009).

Ainda segundo Halbleib e colaboradores (2000), as atividades de DraT e DraG em *R. rubrum* também são afetadas pelo status redox da NifH de maneiras opostas. DraT é mais ativo contra o NifH oxidado, enquanto o DraG é mais ativo usando NifH reduzido como substrato. Os níveis celulares de GTP e NAD⁺ também foram sugeridos para regular a interrupção da nitrogenase, mas nenhum desses sinais foi submetido a uma avaliação sistemática (HALBLEIB; LUDDEN, 1999; NORÉN; NORDLUND, 1994; NORÉN; SOLIMAN; NORDLUND, 1997).

3 JUSTIFICATIVA

As práticas que utilizam o processo natural de fixação de nitrogênio e, conseqüentemente, menor aplicação de fertilizantes nitrogenados, devem ser expandidas. Dessa forma, o processo biológico de fixação do nitrogênio despertou interesse, sendo bastante estudado em laboratórios de todo o mundo, visando a utilização de bactérias diazotróficas como uma forma alternativa de fornecimento de nitrogênio às plantas (MOURE, 2012).

O mecanismo do controle pós-traducional da nitrogenase por ADP-ribosilação vem sendo bastante estudado pelo grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio da Universidade Federal do Paraná. O modelo atual da regulação da nitrogenase em *A. brasilense* envolve a ADP-ribosilação reversível da nitrogenase, catalisada pelo sistema DraT / DraG. Esse processo é regulado pela disponibilidade de amônio ou quando as células são expostas a quantidades extremamente baixas de oxigênio, no caso do *A. brasilense*.

Relevantes estudos já foram realizados sobre a regulação das atividades de DraT e DraG pelo envolvimento das proteínas PII em resposta a amônio, estando este bastante esclarecido (HUERGO *et al.*, 2006a, 2006b; MOURE *et al.*, 2015; NORDLUND; HÖGBOM, 2013). Entretanto, o mecanismo de regulação da atividade da nitrogenase por anaerobiose ainda não foi totalmente elucidado, assim, a proposta desse trabalho é estudar, de forma mais aprofundada, o papel do sinal de energia, ocasionado pela variação de oxigênio, na regulação da atividade das enzimas DraT e DraG.

Assim, um maior entendimento sobre os sinais que controlam a regulação pós-traducional da nitrogenase por anaerobiose melhorará a compreensão dos aspectos funcionais do processo de fixação de nitrogênio em *A. brasilense* e que poderá ser extrapolado para outros diazotrófos que possuem esse mecanismo de regulação.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

- Determinar o mecanismo da regulação pós-traducional da nitrogenase por anaerobiose em *Azospirillum brasilense*.

4.2 ESPECÍFICOS

- Determinar as condições experimentais para desligamento/religamento da nitrogenase do *Azospirillum brasilense* em resposta a anaerobiose;
- Determinar o efeito de mutações nos genes *glnZ*, *glnB* e *draG* no controle da atividade da nitrogenase resposta à anaerobiose;
- Determinar a localização celular de GlnB, GlnZ e DraG durante a regulação por choque anaeróbico;
- Determinar as flutuações nos níveis celulares de ATP, ADP e glutamina em resposta a um choque anaeróbico;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense*

As estirpes de *A. brasilense* que foram utilizadas, suas características fenotípicas e/ou genotípicas, assim como as respectivas concentrações dos antibióticos necessários, estão apresentadas na tabela abaixo (TABELA 1).

TABELA 1 - ESTIRPES DE *A. brasilense* E ANTIBIÓTICOS

Estirpes	Propriedades	Antibióticos (µg/ml)	Referência ou Fonte
<i>A. brasilense</i>			
FP2	Nal ^R Sm ^R Estirpe selvagem, derivada de SP7 Nif ⁺	Nal(10), Sm(1000)	Pedrosa; Yates, 1984
UB2	Nal ^R Km ^R Nif ⁺ <i>draT::km</i>	Nal(10), Km(100)	Zhang <i>et al.</i> , 1992
UB4	Nal ^R Km ^R Nif ⁺ <i>draG::km</i>	Nal(10), Km(100)	Zhang <i>et al.</i> , 1992
FAJ310	Nal ^R Km ^R Nif ⁺ <i>amtB::km</i>	Nal(10), Km(100)	Van Dommelen <i>et al.</i> , 1998
7628	Nal ^R Km ^R Nif ⁺ <i>glnB::km</i>	Nal(10), Km(100)	De Zamaroczy <i>et al.</i> , 1996
7611	Nal ^R Sm ^R Nif ⁺ <i>glnZ::Ω</i>	Nal(10), Sm(100)	De Zamaroczy <i>et al.</i> , 1996
2812	Nal ^R Sm ^R Km ^R Nif ⁺ <i>glnB::km</i> <i>glnZ::Ω</i>	Nal(10), Km(100), Sm(100)	De Zamaroczy <i>et al.</i> , 1996
LFH3	Nal ^R Sm ^R Nif ⁺ Δ <i>glnB</i>	Nal(10), Sm(100)	Huergo <i>et al.</i> , 2006
<i>E. coli</i>			
DH10B	Sm ^r , F' [proAB ⁺ lacZΔM15]	Sm(10)	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
S17.1	Rp4-2 Tc ^r ::Mu Km ^r ::Tn7 Tra ⁺ Sm ^r recA ⁺	Sm (10)	Simon <i>et al.</i> , 1983

* Sm = estreptomicina, Km = canamicina, Nal = ácido nalidíxico. ^R = resistente.

As estirpes 7628 e LFH3 apresentam mutação no gene que codifica a proteína GlnB. Foi necessária a construção de dois mutantes porque, em *A. brasilense*, o gene *glnA*, que codifica para a enzima GS, está localizado a jusante do gene *glnB* e, em condições de limitação de nitrogênio, a expressão de *glnA* ocorre principalmente a partir dos promotores presentes a montante do gene *glnB* (DE ZAMAROCZY; DELORME; ELMERICH, 1990; DE ZAMAROCZY; PAQUELIN; ELMERICH, 1993). Como consequência, a inserção do cassete de resistência à canamicina no gene *glnB* é polar em *glnA*, causando redução na expressão da enzima GS. A atividade da

enzima GS na estirpe 7628 (*glnB::km*) foi reportada como sendo 5 vezes menor do que a observada na estirpe selvagem (HUERGO, 2006).

Para tentar contornar o efeito polar apresentado pelo mutante 7628 (*glnB::km*) um mutante *glnB* não polar (LFH3) foi obtido como descrito por Huergo (2006). Nessa estirpe a expressão da enzima GS no mutante LFH3 foi bem próxima à observada na estirpe selvagem.

5.2 PLASMÍDEOS

A TABELA 2 apresenta os plasmídeos utilizados neste trabalho, e suas características.

TABELA 2 - PLASMÍDEOS

Plasmídeos	Propriedades	Referência ou Fonte
pLHMPHisGN2	Tc ^r (pMP220) expressa as proteínas His-DraT e DraG de <i>A. brasilense</i>	Huergo, 2006
pEMS136	Tc ^r (pLAFR3.18) [<i>nifH::lacZ</i>] expressa NifA de <i>H. seropedicae</i> N-truncada	Souza <i>et al.</i> , 1999

5.3 MEIOS DE CULTURA

5.3.1 Meios para o cultivo de *A. brasilense*

As estirpes de *A. brasilense* foram cultivadas a 30°C em meio NFbHPN lactato (MACHADO *et al.*, 1991) contendo antibióticos adequados. A composição do meio está descrita na TABELA 3.

TABELA 3 – (A) COMPOSIÇÃO DO MEIO NFbHP; (B) MISTURA DE FOSFATOS PARA *Azospirillum brasilense*.

A

Reagentes	gramas/litro
KH ₂ PO ₄	4,0
K ₂ HPO ₂	6,0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	2,0 . 10 ⁻¹
NaCl	1,0 . 10 ⁻¹
CaCl ₂	2,0 . 10 ⁻²
Ácido nitrilotriacético	5,6 . 10 ⁻²
FeSO ₄ . 7H ₂ O	2,0 . 10 ⁻²
Lactato de sódio	5,0
Biotina	1,0 . 10 ⁻⁴
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	2,0 . 10 ⁻³
MnSO ₄ .H ₂ O	2,35 x 10 ⁻³
H ₃ BO ₃	2,8 . 10 ⁻³
CuSO ₄ . 5H ₂ O	8,0 . 10 ⁻⁵
ZnSO ₂ . 7H ₂ O	2,4 . 10 ⁻⁴

B

K ₂ HPO ₄	120 g/L
KH ₂ PO ₄	80 g/L

Quando completo, o meio de cultura apresenta pH próximo de 6,5 e passou a ser denominado NFbHP. O meio NFbHP contém, além destas substâncias, 20 mM de NH₄Cl (NFbHPN) ou 5 mM de glutamato (NFbHPG), além 50 µL/mL da mistura de fosfatos. As soluções de fosfatos, cloreto de amônio e glutamato foram autoclavadas e adicionadas frias ao meio no momento de uso. O meio NFbHP sólido é obtido adicionando-se ágar bacteriológico na concentração de 15 g/L ao meio líquido. E o meio NFbHP semi-sólido foi obtido misturando meio sólido e líquido na proporção de 1/9 no momento do uso, adicionando mistura de fosfato (500 µL para cada 10 mL de meio) e 0,5 mM de glutamato estéril.

5.3.2 Meios para cultivo de *Escherichia coli*

O meio de cultura líquido utilizado no cultivo das estirpes de *E. coli* foi Luria-Broth (LB).

O meio LB apresenta a seguinte composição (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989):

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA LURIA-BROTH (LB).

	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Triptona	10,0

O pH foi ajustado para 7,5 com NaOH 2M. O meio sólido foi obtido a partir da adição de ágar na concentração de 15 g/L ao meio líquido e foi denominado LA.

5.4 ANTIBIÓTICOS

As concentrações finais dos antibióticos empregados foram: canamicina (Km) 100 µg/mL, ácido nalidixico (Nal) 10 µg/mL, estreptomicina (Sm) 80 µg/mL e tetraciclina (Tc) 10 µg/mL.

5.5 ANTICORPOS

Os anticorpos utilizados nesse trabalho estão listados na tabela 5 abaixo:

TABELA 5 - ANTICORPOS UTILIZADOS E SUAS RESPECTIVAS DILUIÇÕES.

Anticorpo	Diluição utilizada	Fonte
Anti-NifH	1:5000	Huergo, 2006
Anti-GlnZ	1:5000	Huergo, 2006
Anti-GlnB	1:2500	Huergo, 2006
Anti-DraG	1:5000	Huergo, 2006
Anti-GS	1:10000	Wally Van Heeswijk
anti-IgG (coelho)	1:5000	Cell Signaling

5.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *A. brasilense* foram cultivadas a 30 °C em meio NFbHPN contendo antibióticos adequados, e incubadas em agitador rotatório a 120 rpm. Os estoques de *A. brasilense* foram mantidos em meio sólido a temperatura ambiente.

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas a 37 °C também incubadas em agitador rotatório a 120 rpm. As células de *E. coli* estocadas em glicerol 50% a -20 °C.

5.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE

As células de FP2, estirpe selvagem de *A. brasilense*, foram pré-inoculadas em meio NFbHPN líquido, contendo antibióticos adequados, e incubadas por 3 dias à 30 °C em agitador rotatório a 120 rpm. Cem mililitros desta cultura foram inoculados em meio NFbHPG contendo 1% de LB, e, então, divididos em 10 frascos de 42 mL. As culturas foram incubadas em um shaker d'água a 30 °C, e então essas culturas foram utilizadas para determinação da atividade da nitrogenase *in vivo*.

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução do acetileno a etileno (DILWORTH, 1966; SCHOLLHORN e BURRIS, 1967). Foi injetado 3,2 mL de acetileno (10 % do volume da fase gasosa) nos frascos de cultura fechados com septo de borracha e, após 20 minutos de incubação a 30 °C em agitador rotatório (120 rpm), a formação de etileno foi determinada em 0,5 mL da fase gasosa do frasco por cromatografia gasosa. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso Varian Star 3400 CX equipado com uma coluna de Porapak N e detector de ionização de chama, a temperatura da coluna foi mantida em 110 °C e do detector em 200 °C, com nitrogênio como gás de arraste e etileno como padrão. O etileno formado foi determinado utilizando a área do pico de etileno padrão (2,23 nmols de etileno a 1 atm e a 25 °C). Para cada cultura, foram feitas a determinação da D.O. 600 nm (densidade óptica a 600 nm) e dosagem de proteína. A atividade da nitrogenase foi expressa como nmol de etileno total formado por minuto por miligrama de proteína total na cultura.

A atividade de nitrogenase em meio semi-sólido foi realizada em frascos de 10 mL contendo 4mL de meio NFbHP contendo 0,5 mM de glutamato. Como inóculo foi utilizado 20 e 40µL de uma cultura saturada previamente cultivada em meio NFbHPN a 30 °C por 18 - 24 h. Após este período, os frascos foram vedados com rolhas de borracha e então injetado acetileno gasoso, deixando reagir por 40 min antes da coleta da fase gasosa para análise.

5.8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de BRADFORD (1976) utilizando o Reagente de Bradford (Sigma). As reações foram realizadas em microplacas de 96 poços, sendo utilizados 30 µL de amostra, para a curva padrão foi utilizada albumina de soro bovino de 20 a 100 µg/mL, e a leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 595 nm. As determinações de proteínas em suspensões de células foram feitas após a lise celular por sonicação.

5.9 DETERMINAÇÃO DO DESLIGAMENTO-RELIGAMENTO DA NITROGENASE EM RESPOSTA A ANAEROBIOSE (switch-off anaeróbio)

Para ensaios de inativação reversível da nitrogenase (switch-off/switch-on) as estirpes de *A. brasilense* foram cultivadas como descrito acima, em agitador rotatório a 120 rpm à 30 °C.

Para a realização do experimento foram preparados 2 cultivos iguais em 10 mL de meio NFbHPG contendo 1% de LB em frascos de 42 mL. Ao se atingir um valor próximo da atividade máxima observada da nitrogenase, um dos frascos foi vedado com uma rolha de borracha e 10% da fase gasosa de acetileno foi injetado, enquanto que do outro frasco uma alíquota de 33 µL da cultura de *A. brasilense* fixando nitrogênio (T_0) foi coletada para análise por Western blot. Feito isso, parou-se a agitação, mantendo os frascos à 30 °C, e a coleta da fase gasosa, para acompanhamento da atividade, e a coleta de alíquotas, para verificar a modificação da nitrogenase continuaram sendo realizadas em intervalos de tempo de 5 minutos. Após completar 30 minutos, os frascos foram novamente submetidos a agitação, continuando as coletas até completar 60 minutos de tempo total do experimento. A atividade da nitrogenase foi determinada de acordo com o item 5.7, e as amostras para Western Blot foram coletadas em 17µL de tampão de amostra (2% SDS, 10% glicerol, 0,01% azul de bromofenol, 62,5 mM Tris HCl pH 6,8 e 5% β-mercaptoetanol) 3x concentrado para eletroforese de proteínas, sendo imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e então armazenadas a -80 °C (HUERGO *et al.*, 2006b; KLASSEN *et al.*, 2005).

5.10 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

5.10.1 Eletroforese sob condições desnaturante (SDS-PAGE)

As amostras proteicas foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12 ou 15% (dependendo da massa molecular da proteína), contendo glicina e SDS (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) ou em gel de poliacrilamida (12 ou 15 %) contendo Tricina e SDS, que permite separar proteínas com massa molecular de 1 a 100 kDa com alta resolução (SCHÄGGER; VON JAGOW, 1987). As soluções foram preparadas conforme descrito por Huergo (2006).

Para se analisar a modificação pós-traducional da nitrogenase, as amostras descongeladas, foram fervidas durante 1 minuto, centrifugadas a 14.500 rpm por 1 minuto, e 6 µL do sobrenadante (equivalente a 1,2 µg de proteína aproximadamente) foi aplicado em gel de poliacrilamida (sob condições desnaturantes) de 12 % utilizando-se uma solução de acrilamida:bisacrilamida 172:1 (KANEMOTO; LUDDEN, 1984).

As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo recomendação do fabricante (Bio-Rad), a 180 V em tampão de corrida (3 g/L de Tris-base; 14 g/L de glicina e 1 % de SDS) por 1 a 2 horas.

5.10.2 Eletroforese sob condições nativas (Native-PAGE)

Eletroforese de proteínas sob condições nativas foram realizadas utilizando o sistema descrito por Huergo (2006) com as seguintes modificações: os tampões de corrida, soluções e tampão de amostra foram preparados sem a adição de SDS e β-mercaptoetanol, as amostras foram aplicadas sem serem fervidas e a corrida foi realizada a 100 V a 4 °C por três horas. A concentração do gel separador foi de 7,5% (acrilamida:bisacrilamida 29:1).

5.11 WESTERN BLOT

Após a corrida, foi feita a transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose PVDF.

Tampões de transferência

Os tampões de transferência foram preparados a partir de duas soluções estoque: Tris HCl 0,5 M pH 10 (1) e ácido capróico 0,4 M (2). São necessários 3 tampões no processo de transferência de proteínas descritos na tabela abaixo:

TABELA 6 - TAMPÕES DE TRANSFERÊNCIA.

Ânodo 1 (A1)	Ânodo 2 (A2)	Cátodo (C)
150 mL solução 1	12,5 mL solução 1	12,5 mL solução 1
50 mL metanol	50 mL metanol	25 mL solução 2
50 mL H ₂ O	187,5 mL H ₂ O	162,5 mL H ₂ O
		50 mL metanol

Os tampões foram armazenados a 4°C.

A membrana de nitrocelulose PVDF (Hybond-P, Amersham Biosciences) foi previamente ativada em metanol por aproximadamente 15 segundos. Com o sistema montado num aparato de transferência semi-seco, a placa do ânodo foi inicialmente coberta com 8 camadas de papel filtro previamente imersas no tampão A1, seguidas de 4 camadas de papel filtro imersas no tampão A2 e da membrana (ativada). Em seguida, o gel foi colocado sobre a membrana tomando o devido cuidado para evitar bolhas de ar no sistema. E por último 12 camadas de papel filtro imersas em tampão C foram então colocadas sobre o gel. Antes de colocar a placa do cátodo para fechar o sistema, foram retiradas bolhas de ar. Enfim, o sistema foi conectado a uma fonte de eletroforese e a condição de transferência foi estabelecida em 80 mA por 1 hora.

As proteínas transferidas para a membrana são então acessíveis para ligação com anticorpos para detecção. Depois da transferência, a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó desnatado 5% em TBST (2,42 g/L Tris pH 7,6; 8g/L NaCl e 1 mL/L tween 20) durante a noite sob agitação a 18 °C. Então, a membrana foi lavada rapidamente com TBST e incubada com o anticorpo primário, que varia de acordo com a proteína de interesse, em uma solução de 1% de leite em TBST, sendo mantida sob agitação durante 1:30 h à temperatura ambiente.

Após incubação com o anticorpo primário, a membrana foi submetida a lavagens com TBST (1x por 15 minutos e 3x por 5 minutos) antes de ser incubada, da mesma forma, com o anticorpo secundário (anti-IgG 1:5000). Por fim, após a etapa de lavagem, a membrana foi submetida a etapa de revelação por filme de raio-X (GE

Healthcare), método que apresentou maior sensibilidade. O revelador utilizado foi WBLUF0500 Luminata Forte Western HRP SUBSTRATE da Merck. No caso da análise da modificação da nitrogenase o anticorpo usado foi o anti-NifH em uma diluição 1:5000.

Para a análise da modificação pós-traducional de glutamina sintetase (GS), foi feito em um gel desnaturante de 7,5 %, aplicou-se 10 µL das amostras coletadas no item 5.9, e correu por 1h a 180 V. Nesse caso incubou-se com o anticorpo primário anti-GS (1:10000) por 2 h.

5.12 DETECÇÃO DE ANTICORPO ATRAVÉS DE UM ANTICORPO CONJUGADO COM FLUORÓFORO

O procedimento inicial foi o mesmo descrito no item 5.11. As amostras foram aplicadas no gel de eletroforese, as bandas de proteína separadas foram então transferidas para a membrana de PVDF. A membrana foi incubada *overnight* com a solução de leite em pó, e então incubada com o anticorpo primário correspondente, nas mesmas condições descritas acima. Porém, na segunda incubação com o anticorpo, substituiu-se o anti-IgG de coelho por um anticorpo secundário marcado com um fluoróforo (Amersham™ ECL™ Plex Goat anti rabbit IgG, Cy™ 5), o qual não pode ser exposto a luz, durante 1 h. Em seguida, as lavagens são feitas com TBST sem tween 20 e a revelação da membrana foi realizada por um escaneador a laser TYPHOON FLA 9500 (GE Healthcare).

5.13 ADIÇÃO DE CCCP

As estirpes de *A. brasilense* foram cultivadas como descrito anteriormente. Em cada frasco adicionou-se uma concentração diferente do ionóforo carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona (CCCP) (25, 50, 100 e 200 µM). Coletou-se alíquotas para análise por Western Blot antes da adição do CCCP, como controle, e após 10 minutos da adição do ionóforo. A atividade da nitrogenase foi também monitorada.

Para analisar o perfil de ADP-ribosilação da estirpe selvagem e dos mutantes sob ação do CCCP, realizou-se uma cinética da reação. Coletou-se a primeira alíquota com a cultura fixando, e, em seguida, adicionou-se 50 µM do ionóforo, e as próximas

alíquotas foram coletadas em pequenos intervalos de tempo (30 s, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 10 min) até completar 10 minutos de reação, onde, segundo o experimento anterior, ocorre a total perda da atividade da nitrogenase. As amostras coletadas foram analisadas por Western Blot.

5.14 ANÁLISE DOS METABÓLITOS ADP, ATP e GLUTAMINA

A metodologia utilizada para extração de metabólitos foi adaptada da metodologia proposta por Bennett e colaboradores (2009). Foram preparados 100 mL das culturas de *A. brasilense* (estirpes selvagem, 7611 e FAJ310) e coletados 10 mL de cada em condições de fixação de nitrogênio, nesse momento parou-se a agitação, e, do mesmo frasco, coletou-se novas amostras após 15 e 30 minutos da cultura parada, voltando a agitação em seguida. As últimas amostras foram coletadas 15 minutos após a volta da agitação.

Dois mililitros dessas amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 20.000 x g, a 4°C e os precipitados foram coletados e processados. Para o processamento, os precipitados foram ressuspensos em 60 µL de tampão de extração a -20 °C (acetonitrila:metanol:água 40:40:20 e ácido fórmico 0,1 M – o ácido é utilizado para garantir a desnaturação rápida e completa de proteínas) e mantidos por 20 minutos a -20 °C. Logo em seguida, os tubos foram centrifugados por 3 minutos a 20.000 x g e 4°C, e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo. Ao precipitado repetiu-se o processo anterior, misturando-se os dois sobrenadantes obtidos. O sobrenadante combinado foi neutralizado com 4 µL de hidróxido de amônio para evitar a degradação de metabólitos por ácido. Os tubos foram então novamente centrifugados para remoção de possíveis partículas em suspensão (20.000 x g, 20 minutos, 4°C). O sobrenadante foi utilizado para análise LC-MS (GERHARDT, 2012)

5.14.1 Preparo das amostras

Soluções padrão dos metabólitos analisados foram preparadas na concentração de 1 mM em água ultrapura e aplicadas inicialmente por injeção direta com fluxo de 0,2 mL/min para determinação da relação massa/carga (m/z) de cada molécula e otimização das condições de ionização. Em seguida, soluções de ADP, ATP e glutamina foram misturadas em concentração final de 1 mM de cada metabólito

e separadas por cromatografia líquida para determinação dos tempos de retenção (RT) e verificação de possível sobreposição dos espectros. Uma faixa de concentração (0,25 μ M a 100 μ M) de cada metabólito foi analisada em duplicata como descrito a seguir para determinação do limite de detecção (mínimo) e faixa linearidade.

5.14.2 Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa – LC-MS

A separação dos metabólitos foi realizada em um equipamento UFLC Prominence (Shimadzu). As fases móveis foram compostas de ácido acético 15 mM e tributilamina 10 mM (A) e metanol (B). A separação dos metabólitos ocorreu em coluna XR-ODS ShimPack (30 mm de comprimento X 3 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 2,2 μ m) mantida sob temperatura fixa de 40°C. As amostras foram colocadas em frascos próprios e mantidas no auto-injetor a 4°C. 10 μ L de amostra foram injetados por corrida num fluxo de 0,2 mL/min. As corridas foram realizadas em duplicata. O gradiente utilizado foi linear com concentração de B crescente, num intervalo de 30 minutos, seguido de 10 minutos de lavagem com tampão A. A pressão máxima foi fixada em 150 Kg/cm².

5.14.3 Detecção dos metabólitos por Espectrometria de Massa e Análise dos dados obtidos

A quantificação dos metabólitos foi realizada em um espectrômetro de massas de alta resolução MicrOTOF-Q IITM (Bruker Daltonics, Billerica, EUA acoplado ao UFLC). As amostras foram analisadas no programa Data Analysis (versão 2.0 SP1 – Bruker) para determinação da m/z e tempo de retenção (RT). Os metabólitos foram analisados pelo método de extração do íon de interesse (usando a opção base peak chromatogram) com janela de erro de $0,05 \pm 0,01$ do pico de interesse.

5.15 TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE *E. coli*

5.15.1 Preparo de células competentes

Para induzir competência, colônias de *E. coli* crescidas em meio LA foram inoculadas em 5 mL de meio LB na presença de antibióticos e incubadas sob agitação por cerca de 16 horas a 37°C. As culturas foram diluídas em meio LB (1:100 v/v) mais

antibióticos e a cultura foi incubada, nas mesmas condições descritas acima, até atingir D.O. 600 entre 0,4 e 0,6. A cultura foi mantida no gelo por 30 minutos.

As células foram coletadas por centrifugação (5000 rpm por 5 min a 4°C), e as células sedimentadas foram delicadamente ressuspensas em 50 mL de água estéril gelada, e novamente centrifugadas, repetindo o processo mais uma vez. Em seguida, foram ressuspensas em glicerol 10%, centrifugadas novamente (mesmas condições) e ressuspensas em volume final de 0,5 mL de glicerol 10%, separadas em alíquotas e estocadas a -80 °C.

5.16 ELETROPORAÇÃO

Para a transformação, as alíquotas de células eletrocompetentes foram descongeladas em banho de gelo e, então, 1 µL os plasmídeos pLHMPThisGN2 e pEMS136 (gentilmente cedidos pelo professor Dr. Luciano Huergo) foram adicionados às células. A solução foi transferida para a cubeta de eletroporação previamente resfriada. A cubeta foi ajustada à câmara de eletroporação e submetida a um único pulso elétrico de aproximadamente 200 Ω e 2,5 kV/cm (voltagem aplicada/distância entre os eletrodos) por 9 milissegundos.

Após o pulso elétrico, a suspensão de células foi transferida para um frasco estéril com 1mL de LB e incubada a 37 °C por cerca de 1 h para recuperação. Após incubação, alíquotas de 200 µL de cultura foram plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos apropriados para seleção dos transformantes. As placas foram incubadas a 37 °C. As colônias obtidas foram coletadas e seu DNA purificado para verificar a presença de plasmídeos conforme descrito a seguir.

5.17 MINI-PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS

A purificação do DNA plasmidial nas bactérias *E. coli* foi realizado segundo o método de lise alcalina modificado (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Uma colônia da bactéria contendo o plasmídeo de interesse foi inoculada em meio LB contendo o antibiótico apropriado e incubado a 37°C sob agitação (120 rpm) por aproximadamente 16 horas. Um volume de cultura de 1,5 mL foi transferido para um tubo e as células foram coletadas por centrifugação a 14.000 rpm durante 1 minuto, à

temperatura ambiente. Em seguida, ressuspensas em tampão GET (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM de EDTA pH 8,0), e a lise celular efetuada com a adição de 1% SDS e 0,2 M NaOH, homogeneizando por inversão. Após este período de tempo, as proteínas foram precipitadas com Kcaf (3 M acetato de potássio e 1,8 M ácido fórmico, pH 4,8). O lisado bacteriano foi homogeneizado por inversão várias vezes, mantido em gelo por 10 minutos e centrifugado por 5 minutos. E, então, ao sobrenadante foi adicionado 100 µL de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). As fases orgânica e aquosa foram misturadas por agitação vigorosa e a emulsão foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi coletada e a ela adicionado 0,6 volumes de isopropanol, com a finalidade de precipitar o DNA plasmidial. A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 80%, centrifugado novamente, o DNA seco a temperatura ambiente e dissolvido em 30 µL de água miliQ.

5.18 CONJUGAÇÃO

Os plasmídeos a serem transferidos para as estirpes de *A. brasilense* foram mantidos em *E. coli* S17.1 (HUERGO, 2006).

As estirpes de *A. brasilense* (receptora) e *E. coli* S17.1 contendo o plasmídeo de interesse (doadora) foram cultivadas nos meios NFbHPN e LB, respectivamente, com os devidos antibióticos. Cinco microlitros da cultura de *E. coli* foram utilizados para inocular 2 mL de meio LB sem antibióticos e o inóculo foi mantido sob agitação a 37°C por 6 horas. Paralelamente, 100 µL da cultura de *A. brasilense* foram utilizados para inocular 5 mL de meio NFbHPN sem antibióticos, mantido a 30°C sob agitação por 8 horas.

Em seguida, 50µL de *A. brasilense* foram misturados com 5µL de *E. coli*, as células foram, então, plaqueadas como uma gota em meio LA:NFbHPN nas proporções 1:1; 1:2 e 1:3, e incubadas a 30 °C durante 24 horas. A massa celular foi raspada, suspensa em 250 µL de NFbHPN e plaqueada em meio NFbHPN contendo os antibióticos para seleção da estirpe de *A. brasilense* e do plasmídeo. As placas foram incubadas novamente a 30°C e as colônias obtidas coletadas.

5.19 PREPARAÇÃO DE FRAÇÃO DE MEMBRANA DE *A. brasilense*

Como o experimento envolve o comportamento celular em anaerobiose, todo o experimento foi realizado sob um jato de gás inerte, nesse caso o gás utilizado foi o nitrogênio, sempre fechando bem os frascos e evitando o máximo possível o contato com o oxigênio do ar.

Foram coletados 20 mL de cultura de *A. brasilense* em meio NFbHPG, obtidos conforme descrito anteriormente, nos diferentes tempos: T₀ (amostra fixando N₂), T₁₅ (após 15 minutos sem agitação) e T₃₀ (15 minutos após o reinício da agitação). Assim que coletadas as alíquotas foram colocadas no gelo e imediatamente centrifugadas a 4.800 rpm por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado congelado a -80 °C.

Inicialmente o tampão SP (NaCl 8,5g/L; K₂HPO₄ 7g/L; KH₂PO₄ 3g/L; pH 7,2) utilizado foi submetido ao jato de gás nitrogênio, por aproximadamente 20 min, para a remoção do oxigênio dissolvido.

Posteriormente, as células congeladas foram, então, ressuspensas em 2 mL de tampão e sonicadas com 5 pulsos de 15 segundos com intervalos de 15 segundos no sonicador MSE Soniprep 150 usando amplitude de 20 µm, sempre sob o jato de nitrogênio. O extrato celular foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos a 4 °C.

Uma fração (200 µL) do sobrenadante foi retirada consistindo na fração celular total. O restante do sobrenadante foi, então, submetido a ultracentrifugação a 200.000 g por 1 h a 4 °C. O sobrenadante (200 µL) foi armazenado e representa a fração citoplasmática do extrato.

O precipitado foi ressuspendido em 2 mL de tampão SP e submetido à nova ultracentrifugação, sob as mesmas condições, descartando-se o sobrenadante. Repetiu-se esse processo mais duas vezes. Então, o precipitado foi ressuspenso em 200 µl de tampão SP, e essa alíquota consistiu na fração de membrana dos extratos (HUERGO, 2006). As frações celulares foram analisadas por Western Blot.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CURVA DE ATIVIDADE DA NITROGENASE DA ESTIRPE FP2 DE *Azospirillum brasilense*

A determinação da curva de atividade da nitrogenase é fundamental, pois é importante saber em quanto tempo de incubação a cultura FP2 (estirpe selvagem) de *A. brasilense* atinge a atividade máxima da nitrogenase e, por quanto tempo essa atividade se mantém. Assim como a D.O. 600 e a quantidade de proteína da cultura quando a atividade máxima é atingida, pois é nessa fase que todas as etapas do trabalho foram realizadas.

Para a realização desse experimento, células de FP2 foram cultivadas como descrito no item 5.3, e em intervalos de tempo verificou-se a atividade, a D.O. 600 e dosou-se a quantidade de proteína. Os resultados obtidos estão representados na FIGURA 15. Pode-se observar que a atividade da nitrogenase na estirpe FP2 de *A. brasilense* atingiu seu valor máximo após 18 h de incubação e manteve-se constante até aproximadamente 26 h. Ensaios realizados com os mutantes *glnZ* e *amtB* mostraram perfis semelhantes ao da estirpe selvagem (dados não mostrados).

Esse intervalo de tempo em que a nitrogenase atinge sua atividade máxima foi utilizado para os ensaios de desligamento anaeróbico. A atividade máxima da nitrogenase ocorre na cultura com D.O. 600 de aproximadamente 1,2 e aproximadamente 0,2 mg/mL de proteína.

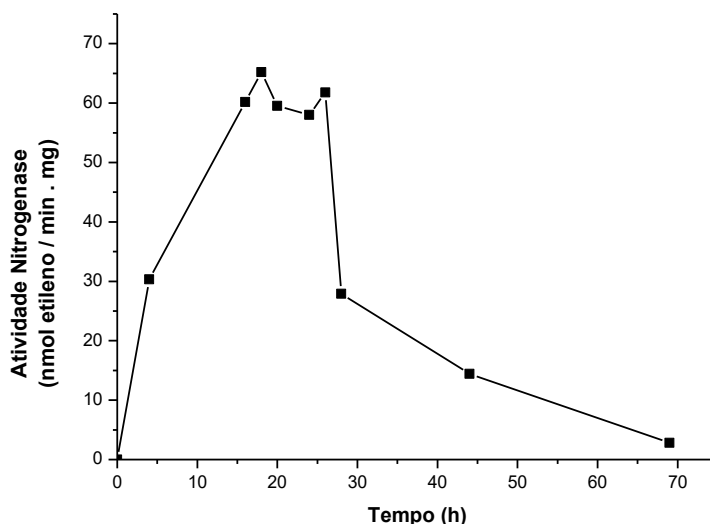


FIGURA 15 – CURVA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE SELVAGEM DE *Azospirillum brasilense*.

Fonte: A autora (2016)

Nota: FP2 foi cultivada em meio NFbHP acrescido de 5 mM de glutamato e 1% de LB. A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução do acetileno a etileno, sendo a formação de etileno monitorada por cromatografia gasosa. Essa atividade foi expressa em nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína em função do tempo. Atividade medida nos tempos 0, 4, 16, 18, 20, 24, 26, 28, 44 e 69 h.

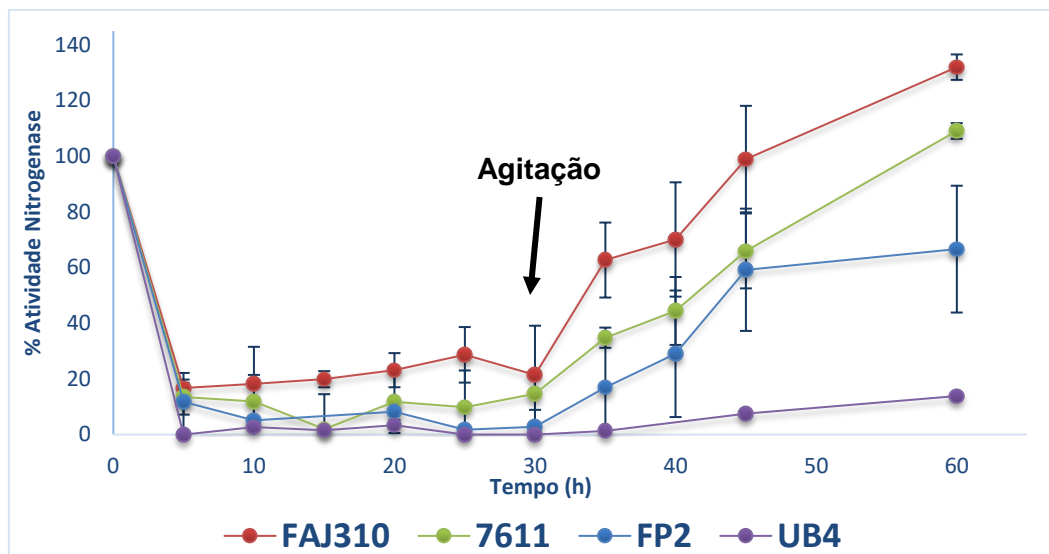
6.2 DESLIGAMENTO / RELIGAMENTO ANAERÓBICO DA NITROGENASE POR ADP-RIBOSILAÇÃO DE PROTEÍNA Fe

Para entender o mecanismo pelo qual ocorre o desligamento / religamento da nitrogenase por anaerobiose foram realizados ensaios com as estirpes de *A. brasilense* FP2 (selvagem), 7611 (mutante *glnZ*), FAJ 310 (mutante *amtB*) e UB4 (mutante *draG*).

As estirpes de *A. brasilense* foram cultivadas de acordo com o item 5.3.1. Após, aproximadamente 20 h, as estirpes FP2, FAJ 310, 7611 e UB4 apresentaram atividades iniciais da nitrogenase de 65,9; 70,6, 62,4 e 29,4 nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína, respectivamente. Foram coletadas alíquotas para análise por Western Blot em cada tempo amostrado para atividade da nitrogenase. Nesse momento iniciou-se o experimento conforme descrito no item 5.9.

Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes, e o perfil médio da atividade da nitrogenase do FP2 e dos mutantes está representado na FIGURA 16.

A



B

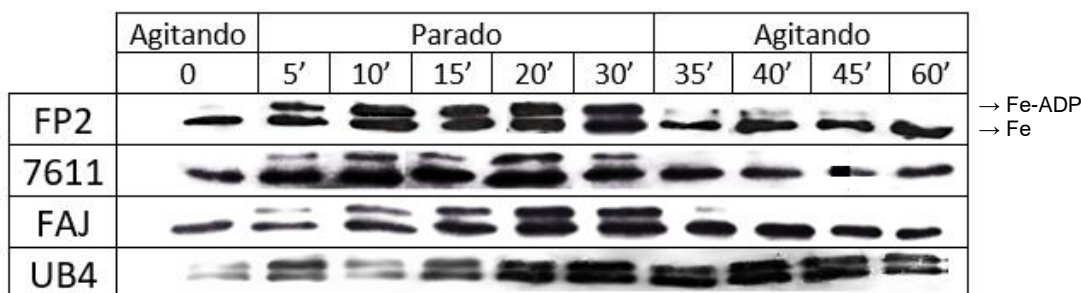


FIGURA 16 - REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE E ADP-RIBOSILAÇÃO POR ANAEROBIOSE

Fonte: A autora (2016)

Nota: **A** - No tempo zero, as células foram submetidas a condições de anaerobiose e aos 30 minutos foram devolvidas a um estado microaeróbico (agitação novamente). Cada ponto representa (em porcentagem) a média de pelo menos três experimentos independentes. Os valores das médias das atividades iniciais das estirpes FP2, FAJ 310, 7611 e UB4 de *A. brasilense* foram 65,9; 70,6, 62,4 e 29,4 nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína. **B** – Western Blot: ADP-ribosilação da proteína NifH por anaerobiose em função do tempo em estirpes de *A. brasilense*. 2 µg de proteína de cada amostra foram aplicadas em um gel desnaturante 12 % (acrilamida:bis de 172:1), transferidas para uma membrana de PVDF e reveladas em filme de raios-X.

Observando a FIGURA 16a nota-se que o perfil de inativação da nitrogenase do mutante *glnZ* foi bastante semelhante ao do FP2, com uma perda da atividade da nitrogenase de aproximadamente 85 % nos primeiros 5 minutos de anaerobiose. Entretanto, a recuperação dessa atividade após as células serem ressubmetidas a agitação para restaurar os níveis de oxigenação, foi mais rápida para o mutante *glnZ* quando comparada a estirpe FP2, com recuperação de 100 % da sua atividade no tempo de 60 minutos. Para a estirpe FP2, no mesmo tempo, a recuperação foi de aproximadamente 66 %. Esse resultado difere do que foi descrito na literatura, pois

Klassen e colaboradores (2001) e Huergo (2006) descrevem uma recuperação total da atividade da estirpe selvagem logo nos primeiros minutos após a volta da agitação. Em ambos os casos, a cultura ficou em anaerobiose por apenas 10 minutos, enquanto que nesse trabalho esse tempo foi de 30 minutos. O que sugere que quanto maior o tempo que as células ficarem em um estado de anaerobiose, mais difícil será a recuperação da atividade da nitrogenase.

O mutante *amtB* apresentou uma menor perda de atividade, cerca de 70 %, porém a recuperação da atividade da nitrogenase foi similar a estirpe 7611, com a recuperação de 100 % da atividade inicial em 60 minutos.

Klassen e colaboradores (2001) observaram também que o mutante *glnZ* mostrou recuperação apenas parcial, de 20 a 40 % depois de 80 minutos após o choque de amônio. Considerando que a atividade do FP2 foi recuperada totalmente dentro de 10 minutos, no que diz respeito à regulação da nitrogenase por íons amônio, que a proteína GlnZ está envolvida no mecanismo de reativação da proteína de ferro ADP-ribosilada, já com relação à regulação por choque anaeróbico GlnZ não parece estar envolvida.

Com relação à modificação de proteína Fe, em todas as estirpes (FP2, 7611 e FAJ310) após 5 minutos sem agitação foi possível observar a presença de duas bandas da proteína Fe: uma banda correspondente a subunidade de proteína Fe ADP-ribosilada (superior) e uma banda corresponde a subunidade de proteína Fe não modificada (inferior), concomitantemente com a perda da atividade da nitrogenase (FIGURA 16b). E, com a volta da agitação, observou-se o desaparecimento da banda da proteína Fe ADP-ribosilada, juntamente com a reativação da nitrogenase.

Os resultados sugerem que GlnZ e AmtB não estão, pelo menos não diretamente, ligados ao mecanismo de inativação anaeróbica nem na reativação da nitrogenase quando condições de fixação de N₂ são restabelecidas (HUERGO, 2006; KLASSEN *et al.*, 2001). Considerando que ambas as proteínas estão envolvidas no mecanismo de desligamento / religamento por amônio da nitrogenase, parece haver duas vias de sinalização distintas para controlar a atividade desta proteína dependendo do estímulo.

A regulação pós-traducional da nitrogenase na presença de íons amônio, envolve as proteínas DraT e DraG, onde esta última catalisa a remoção de um grupamento ADP-ribosil da NifH, sendo a atividade da nitrogenase restaurada.

Para se avaliar se o mesmo mecanismo ocorre na regulação em anaerobiose, o mesmo experimento acima foi realizado com a estirpe UB4 (mutante *draG*). Na FIGURA 16a é possível observar que nos primeiros 5 minutos em anaerobiose a atividade da nitrogenase do UB4 reduziu para 5 % da inicial, e que quando a cultura volta para as condições de microaerofilia, não ocorrem a retomada dos níveis iniciais de atividade. Esse resultado mostra que a proteína DraG é necessária para a reativação da nitrogenase após depleção de energia, pois a não retomada da atividade ocorre devido a não retirada do grupo ADP-ribosil da proteína Fe, reação catalisada pela DraG. Além, do perfil da atividade observado, houve uma redução, em relação à estirpe FP2, na atividade inicial da nitrogenase, a qual foi de 29,4 nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína. Esta redução se deve à modificação parcial de NifH ainda durante as condições de fixação de nitrogênio, que é observada nos ensaios de Western Blot, na FIGURA 16b.

O mutante UB4 (*draG*) modificou a proteína em resposta a anaerobiose, mas foi incapaz de reverter a modificação. Como UB4 (*draG*) mostrou um baixo acúmulo de proteína Fe modificada antes de uma mudança para condições anaeróbias, o que não ocorreu em nenhuma das outras estirpes onde DraG está presente, reforça a proposta apresentada por Huergo e colaboradores (2006b), que, mesmo em condições de fixação de nitrogênio, há um nível basal de atividade de DraT, que no selvagem é compensado pela ativação de DraG. Ou seja, sabendo que GlnB não-uridilada ativa DraT (MOURE, 2012), talvez, mesmo em condições de fixação de N₂, onde GlnB encontra-se uridilada, sempre haja um nível basal de GlnB não-uridilada o qual mantém DraT ativa a um nível basal. À vista disso, uma questão de extrema importância é entender como DraT é ativada por anaerobiose.

De qualquer forma, pode-se afirmar que o sistema DraT / DraG é responsável pela regulação da atividade da nitrogenase em resposta ao desligamento anaeróbio, assim como em resposta ao choque de amônio, em *A. brasilense* (ZHANG *et al.*, 1993). As atividades de DraT e DraG, por outro lado, são controladas pela presença de estímulos externos diferentes, e as vias de sinalização ainda não foram claramente definidas (HUERGO *et al.*, 2005).

Lowery e Ludden (1988), sugeriram que a regulação das atividades de DraG e DraT é controlada através de alterações na sua acessibilidade ao seu substrato, dinitrogenase redutase, em vez de através da modulação direta da sua atividade.

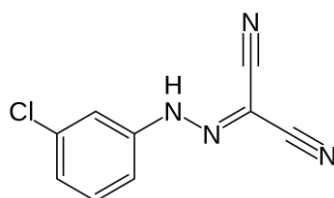
Hartmann e Burris (1987) sugeriram que, como não há aumento no reservatório de glutamina celular ou modificação da glutamina sintetase sob condições de desativação anaeróbica (dados mostrados no item 6.4.1), um sinal redox seria responsável por desencadear a modificação covalente da nitrogenase de forma independente do controle de nitrogênio da célula. Assim como foi observado por Halbleib e colaboradores (2000) em *R. rubrum* que DraT é mais ativa quando NifH está oxidada, enquanto DraG é mais ativa quando NifH está reduzida.

Estes modelos são concordantes com os resultados apresentados até aqui.

6.3 ADIÇÃO DE CCCP

Os agentes de desacoplamento, como carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona (CCCP), foram previamente utilizados em culturas de *R. rubrum* para estudar o efeito das variações dos níveis de ATP na regulação da atividade da nitrogenase. Resultados prévios mostraram que os desacopladores causaram uma rápida redução da concentração de ATP (ZHANG *et al.*, 1993).

A estrutura do CCCP está representada na FIGURA 17. O protonóforo CCCP é um ácido lipossolúvel fraco que pode transpor H^+ pela barreira lipídica da membrana mitocondrial sem transitar pela ATP-sintetase (ALAVIAN *et al.*, 2011). Depois de entrar na matriz mitocondrial na forma protonada ele se dissocia do próton. Esse mecanismo dissipa o gradiente de prótons gerado pela cadeia transportadora de elétrons e, portanto, elimina o potencial de membrana. Há interrupção da síntese de ATP sem bloquear o consumo de O_2 , pois tanto a oxidação de substratos, quanto o bombeamento de H^+ continuam, mesmo na ausência de ADP (MIRANDA *et al.*, 2005). Esse mecanismo é ilustrado pela FIGURA 18.



CCCP

FIGURA 17 - ESTRUTURA QUÍMICA DO CARBONIL CIANETO M-CLOROFENIL HIDRAZONA (CCCP).

Fonte: Hollenbeck; Bray; Adams (1985)

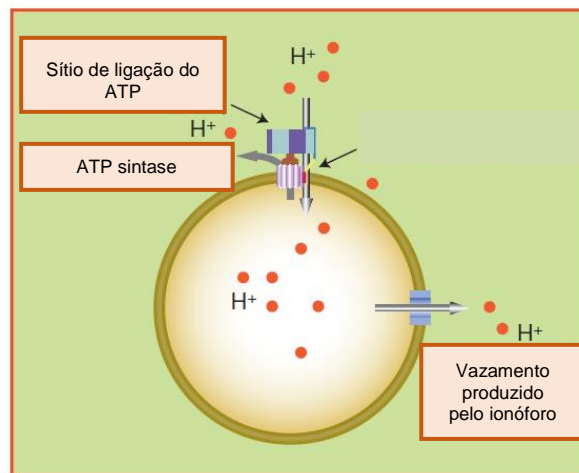


FIGURA 18 - MECANISMO GERAL DE AÇÃO DE UM DESACOPLADOR NA MEMBRANA MITOCONDRIAL

Fonte: Adaptado de Alavian *et al.* (2011)

A atividade da nitrogenase de *A. brasilense* foi avaliada na presença de diferentes concentrações de carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP), como descrito no item 5.13. Como mostrado na FIGURA 19a, em todos os casos houve perda da atividade da nitrogenase de mais de 90 % após 10 minutos de tratamento com CCCP, e, é possível observar, associado à perda da atividade, que a proteína NifH é ADP-ribosilada. Essa inativação pela adição do CCCP é permanente. Para controle, foram feitos experimentos com culturas de FP2 em condição de fixação de nitrogênio e submetidas a um choque de amônio, adicionando 1 mM de NH_4Cl durante 5 minutos, no qual sabe-se que ocorre a ADP-ribosilação de umas das subunidades da proteína Fe (FIGURA 19b).

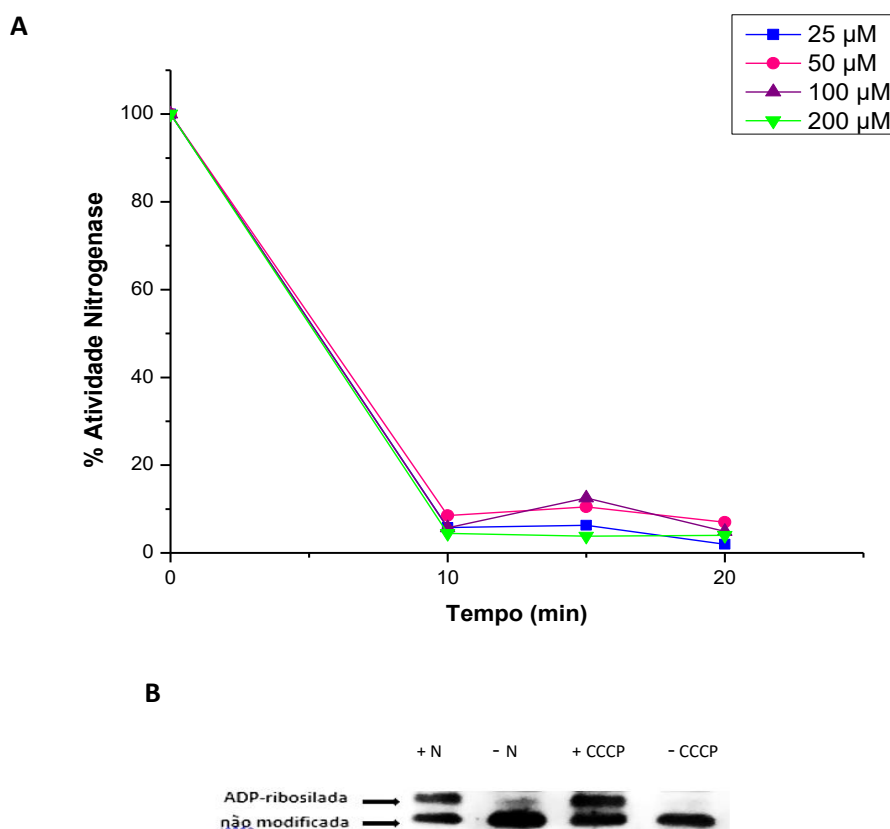


FIGURA 19 – EFEITO DO CCCP NA ATIVIDADE DA NITROGENASE DA ESTIRPE FP2 DE *A. brasilense*

Fonte: A autora (2016)

Nota: (A) Tempo 0, corresponde a 100% da atividade. Após 20 minutos da adição de CCCP não foi observada a reativação da nitrogenase. (B) ADP-ribosilação da proteína Fe onde -N e -CCCP correspondem a amostras fixando (anterior a adição de NH_4Cl e CCCP), e +N e +CCCP correspondem a amostras 5 minutos após a adição de 1 mM de NH_4Cl ou 10 minutos após a adição de 200 μM de CCCP, respectivamente.

O resultado acima concorda com os resultados obtidos por Kanemoto e Ludden (1984) durante estudos da adição de CCCP em *R. rubrum*, onde foi observada a inativação da proteína Fe por ADP-ribosilação. Entretanto, os autores citam que a perda da atividade da nitrogenase foi bastante rápida, enquanto o processo de ADP-ribosilação foi mais lento. Para verificar se o mesmo ocorre com *A. brasilense*, realizou-se uma cinética de ADP-ribosilação de NifH, coletando amostras para análise 30 segundos após a adição do desacoplador, e então a cada minuto até completar 10 minutos de reação, onde ocorre a perda de mais de 90% da atividade da nitrogenase. Monitorou-se também a atividade da nitrogenase após 5 e após 10 minutos de reação. O resultado está representado na FIGURA 20 abaixo.

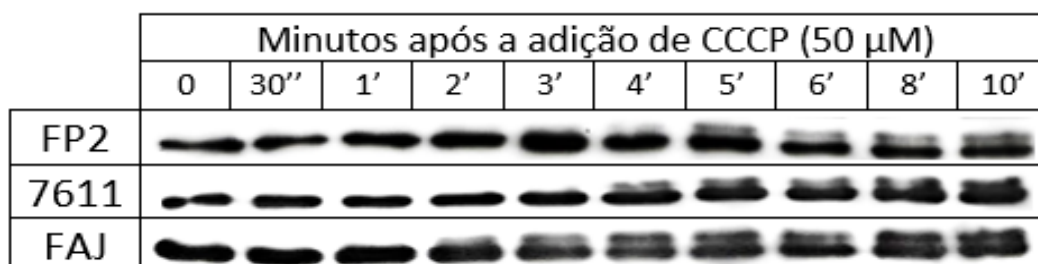


FIGURA 20 - CINÉTICA DE ADP-RIBOSILAÇÃO DA PROTEÍNA FE NAS ESTIRPES FP2, 7611 E FAJ 310 DE *A. brasilense* APÓS ADIÇÃO DE CCCP

Fonte: A autora (2016)

Nota: No tempo 0 foi coletada uma amostra e, então, adicionado 50 μ M de CCCP.

O experimento acima foi realizado em duplicata biológica.

A atividade da nitrogenase 5 minutos após adição de CCCP tinha diminuído cerca de 80 % tanto na estirpe selvagem como nos mutantes.

Como já se sabe, a presença do CCCP diminui os níveis de ATP, interrompendo assim o fluxo de elétrons, então essa perda de atividade reforça a sugestão de um papel regulador do fluxo de elétrons na inativação da nitrogenase, uma vez que no desligamento anaeróbico, um sinal derivado do estado redox, pode desencadear a modificação da proteína Fe.

Por outro lado, no tempo 5' apenas o mutante FAJ310 apresenta aproximadamente 80 % de ADP-ribosilação da proteína Fe, as estirpes FP2 e 7611 (*glnZ*) apresentarem cerca de 30 % de ADP-ribosilação, portanto a atividade da nitrogenase foi menor que o previsto a partir da ADP-ribosilação, sugerindo que depleção de ATP é também causa de perda de atividade da nitrogenase como sugerido por Kanemoto e Ludden (1984).

Zhang e colaboradores (1994) observaram que no mutante *ntrBC*, após adição de amônio, a atividade da nitrogenase cai para um nível residual de 60%, mas que mais de 80% da proteína Fe não foi modificada, sugerindo um segundo mecanismo regulador que responde ao NH_4^+ mas que não envolve ADP-ribosilação da dinitrogenase redutase. Ensaios realizados em *Rhodobacter capsulatus* também apresentaram resultados semelhantes (PIERRARD; LUDDEN; ROBERTS, 1993).

Estes resultados sugerem que a perda de atividade da nitrogenase e ADP-ribosilação da proteína Fe em anaerobiose estão associados à depleção de energia. Em concordância com esta sugestão, Zhang e colaboradores (1993) mostraram que

a adição de nitrato (NO_3^-) como aceptor de elétrons durante a anaerobiose impede o desligamento da nitrogenase.

6.4 POSSÍVEIS SINAIS METABÓLICOS ENVOLVIDOS NO DESLIGAMENTO ANAERÓBICO DA NITROGENASE

A relação ATP/ADP é um parâmetro no controle central do metabolismo da energia celular, que determina a variação de energia livre para a hidrólise de ATP. Portanto, a relação ATP/ADP é um indicador do consumo de energia e mudanças no estado de energia celular (TANTAMA *et al.*, 2013). Em resposta à adição de NH_4^+ , a razão ATP / ADP diminuiu em *R. rubrum* e *K. pneumoniae* quando N_2 era a única fonte de nitrogênio (KANEMOTO; LUDDEN, 1984). Huergo e colaboradores (2009) relataram que o ATP, ADP e 2-OG desempenham um papel chave na interação de PII de *A. brasilense* com as proteínas reguladoras DraT e DraG *in vitro*.

Estudos iniciais sugeriram que um único metabólito poderia servir como um sinal para regular DraG e DraT. Pelo fato de DraT requerer NAD^+ para ADP-ribosilação, então NAD^+ seria um metabólito regulatório em potencial em condições de anaerobiose, embora as concentrações de NAD^+ e NADH em *R. rubrum* parecessem ser estáveis durante o desligamento por NH_4^+ . Segundo Hartmann e Burris (1987) e Zhang e colaboradores (1993) a concentração de glutamina altera durante o desligamento por NH_4^+ , mas não durante o desligamento anaeróbico.

Para determinar a variação desses metabólitos potencialmente envolvidos na regulação da atividade de DraT e DraG em função do estado energético celular, células de *A. brasilense* FP2, 7611 e FAJ310 foram crescidas e coletadas conforme descrito em Materiais e Métodos e os metabólitos ATP, ADP, glutamina e NAD^+ foram separados e analisados por LC/MS.

Após análise dos extratos foi possível a detecção dos metabólitos ADP e ATP. Glutamina e NAD^+ não foram detectados nos extratos possivelmente devido a concentração muito baixa. Foram obtidos cromatogramas com as massas monoisotópicas dos metabólitos ATP e ADP. A FIGURA 21 mostra os espectros com as massas monoisotópicas e os tempos de retenção para cada metabólito.

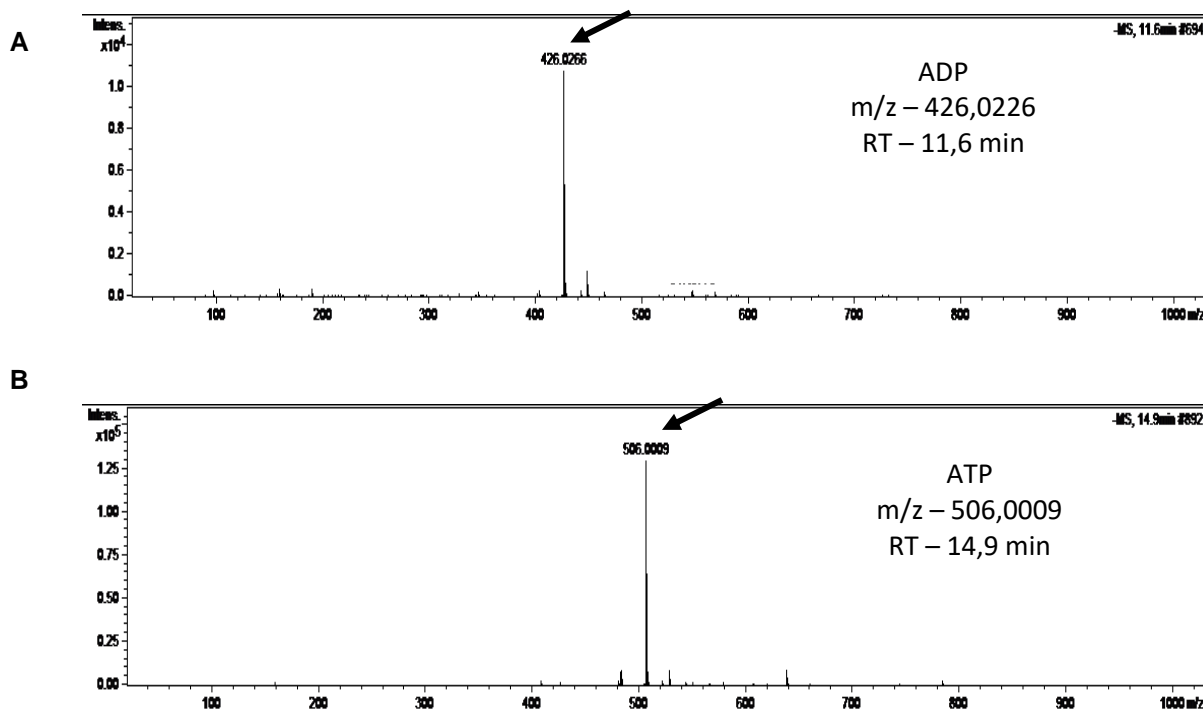


FIGURA 21 – ESPECTRO DE MASSA DOS PADRÕES DOS METABÓLITOS ADP (A) E ATP (B) OBTIDOS EM ESPECTROMETRO microTOF-Q

Fonte: A autora (2016)

Nota: Espectro obtido no pico de eluição de cada molécula. A separação dos metabólitos foi realizada em UFLC Prominence (Shimadzu). As fases móveis foram compostas de ácido acético 15 mM e tributilamina 10 mM (A) e metanol (B). A separação dos metabólitos ocorreu em coluna XR-ODS ShimPack (30 mm de comprimento X 3 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 2,2 μ m) mantida sob temperatura fixa de 40°C. À direita estão apresentados o nome da molécula, a relação massa carga m/z e o tempo de retenção. As setas indicam o pico de cada molécula.

A FIGURA 22 representa o cromatograma mostrando o perfil de eluição do ADP e do ATP durante o experimento. Cada gráfico representa a média das áreas de cada pico obtidos em três replicatas biológicas para todas as estirpes.

Como, em todos os casos, ocorre um decréscimo nos níveis de ATP e ADP, é de se esperar que ocorra um aumento nos níveis de AMP, porém não foi possível detectar esse metabólito, talvez por problemas no aparelho. Dessa forma, análises mais aprofundadas devem ser realizadas com a utilização de um padrão interno para um dos metabólitos.

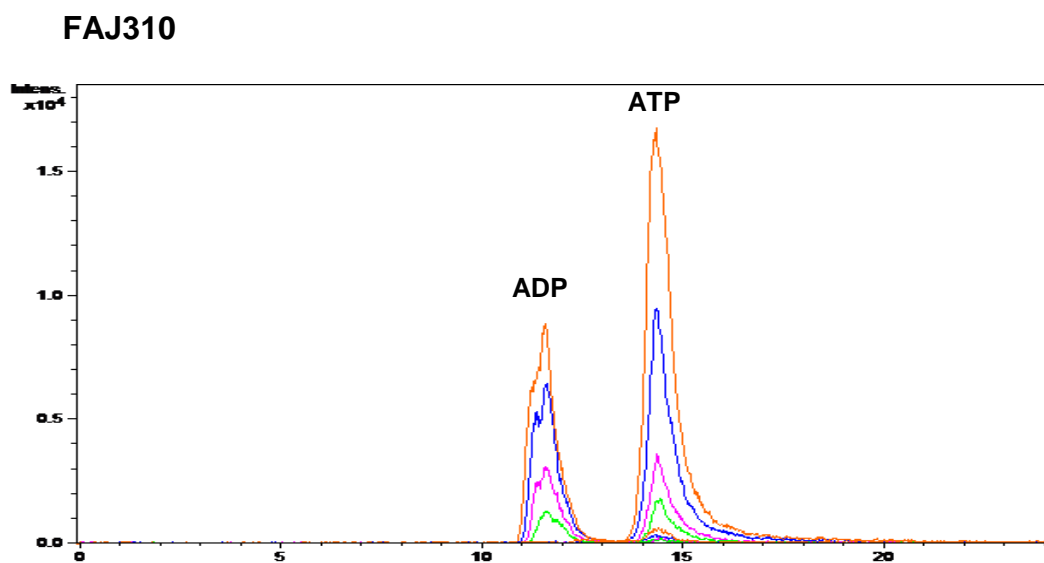
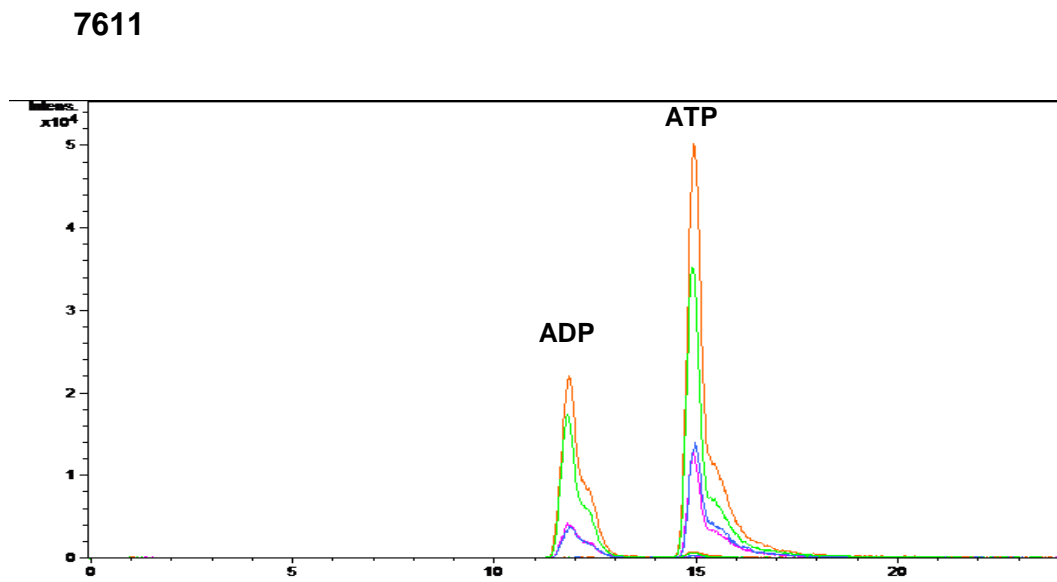
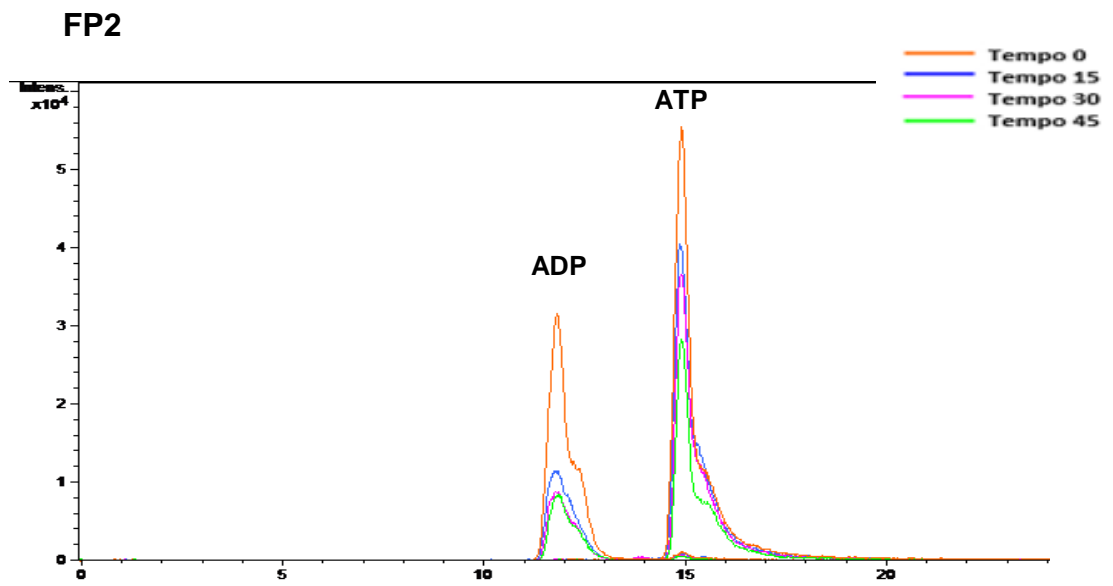


FIGURA 22 - DOSAGEM DE METABÓLITOS INTRACELULARES EM *A. brasilense*

Fonte: A autora (2016)

Nota: Cromatogramas de extratos das estirpes selvagem (FP2), mutante *glnZ* (7611) e mutante *amtB* (FAJ 310) de *A. brasilense*. Tempo 0 - alíquotas coletadas sob condições de fixação de nitrogênio, Tempo 15 - amostras coletadas após 15 minutos sem agitação, Tempo 30 – amostras coletadas após 30 minutos sem agitação e Tempo 45 – amostras coletadas 15 minutos após reinício da agitação novamente. Alíquotas foram coletadas, processadas e analisadas por LC/MS como descrito em Materiais e Métodos.

As estirpes de *A. brasilense* apresentaram um decréscimo de ambos ATP e ADP no período anaeróbico no qual a cultura estava sem agitação. Na estirpe FP2 a queda dos níveis de ADP foi mais acentuada em comparação com a queda dos níveis de ATP. Porém, no tempo 45 (30 min sem agitação + 15 min após retorno da agitação) os níveis de ADP permaneceram iguais ao tempo 30, e os níveis de ATP continuaram diminuindo mesmo com o reinício da agitação, sendo necessário um tempo maior para a recuperação dos metabólitos. Na estirpe FAJ310 (*amtB*) houve um decréscimo progressivo tanto do ADP como do ATP, e no tempo 30 as áreas dos picos de ambos os metabólitos se igualaram. Com o reinício da agitação os níveis de ADP e ATP continuaram relativamente baixos, não havendo recuperação no tempo de 15 minutos. Já a estirpe 7611 apresentou uma redução relativa bastante significativa dos dois metabólitos nos tempos 15 e 30, enquanto que no tempo 45 observou-se recuperação quase completa dos níveis de ADP e ATP. Esse resultado do mutante *glnZ* corrobora o perfil de atividade da nitrogenase, onde a recuperação da atividade foi mais rápida que na estirpe selvagem, e de Western Blot, onde após 5 minutos da volta da agitação a banda da proteína ADP-ribosilada já não foi observada (FIGURA 16). Assim como o resultado da estirpe FP2, onde 15 minutos do reinício da agitação não foram suficientes para a recuperação da atividade da nitrogenase nem dos níveis de ADP e ATP. Já com relação a estirpe FAJ310, não houve recuperação dos níveis dos metabólitos, mesmo com a volta da agitação os níveis caíram ainda mais. Esse resultado difere do perfil de reativação da nitrogenase (FIGURA 16), onde com 15 minutos de volta a agitação a recuperação da atividade da nitrogenase foi de quase 100%, pois quase não era possível ver a banda da proteína Fe ADP-ribosilada.

Assim, a relação ATP/ADP parece, de alguma forma, estar relacionada ao mecanismo de regulação da atividade da nitrogenase por depleção de energia e por amônio, porém não está claro como acontece. Outros autores observaram que as flutuações de ATP/ADP induzidas pela escuridão são insuficientes para explicar a regulação pós-traducional da nitrogenase em *R. rubrum* (ZHANG; POHLMANN;

ROBERTS, 2009; KANEMOTO; LUDDEN, 1984). Assim é possível que outros sinais também atuem em *A. brasilense*. Relacionando a área de cada pico obteve-se uma relação ATP/ADP para cada um dos tempos das estirpes de *A. brasilense* apresentadas na TABELA 7.

TABELA 7 - RELAÇÃO DAS MÉDIAS DAS ÁREAS DOS PICOS DE ATP E ADP NOS DIFERENTES TEMPOS NAS ESTIRPES FP2, FAJ310 E 7611 DE *A. brasilense*

Estirpes	Tempo 0	Tempo 15	Tempo 30	Tempo 45
FP2	1,6	3,1	4,2	3,2
FAJ310	1,8	1,4	1,2	1,5
7611	1,9	2,8	2,9	1,8

Nas estirpes FP2 e 7611 houve um aumento na relação das áreas dos picos ATP/ADP durante anaerobiose, já na estirpe FAJ310 pode-se observar uma queda na relação entre os metabólitos, o que era esperado observar nos três casos, pois com baixos níveis de oxigênio presume-se que ocorra um decréscimo dos níveis de ATP celulares, o que logicamente, provocaria um aumento nos níveis de ADP, provocando uma diminuição na relação ATP/ADP.

Segundo Zhang e colaboradores (2009) vários fatores interferem na detecção dos níveis de ATP *in vivo*. Há dois desafios principais: (i) o metabolismo da célula deve ser interrompido rapidamente para que o nível de ATP não seja alterado durante o processamento; (ii) na célula o ATP existe em associação com muitas proteínas, e é impossível saber qual fração do ATP é libertada em cada um dos diferentes métodos de extração, desta forma os níveis de ATP detectados são altamente dependentes do método de extração utilizado, dessa forma para fins de comparação é necessário observar o método de extração de quantificação.

Devido a esses fatores análises complementares precisam ser realizadas para a validação desses resultados.

6.4.1 Análise de modificação da GS em condições anaeróbicas

Como os metabólitos glutamina e NAD⁺ não foram detectados diretamente em nenhum dos tempos analisados, a concentração intracelular de glutamina foi analisada indiretamente através da determinação da modificação pós-traducional da

GS por Western blot utilizando anticorpo anti-GS. A GS é uma enzima dodecamérica e tem sua atividade controlada pela adição covalente de um grupamento adenilil a cada uma de suas subunidades. Em altos níveis de nitrogênio fixado, a adenilil transferase (ATase) complexa com a GlnB não modificada e com glutamina e catalisa a adenililação da glutamina sintetase, inativando-a. Em baixas concentrações de nitrogênio fixado, a glutamina sintetase é ativada por desadenililação também catalisada pela ATase complexada à proteína GlnB-UMP (NORDLUND e HÖGBOM, 2013). Consequentemente, a modificação da GS serve como um indicativo dos níveis de nitrogênio (glutamina) intracelular (HARTMANN; BURRIS, 1987).

Em culturas de *A. brasilense* FP2 submetidas ao desligamento da nitrogenase por anaerobiose não ocorreu a adenilação de GS (FIGURA 23), nem quando a atividade da nitrogenase foi diminuída consideravelmente. Segundo esses resultados obtidos, a glutamina não parece estar envolvida no desligamento em resposta a anaerobiose. Esse resultado está de acordo com o que foi anteriormente proposto. De acordo com Zhang e colaboradores (1997), a ativação de DRAT por NH_4^+ requer glutamina sintetase ativa e levou a um aumento nos níveis de glutamina. Em contraste, não houve alteração das concentrações de glutamina quando as células são submetidas a anaerobiose. Hartmann e Burris (1987) e Zhang e colaboradores (2006) também relataram que o pool de glutamina mudou durante o desligamento de NH_4^+ , mas não durante os tratamentos anaeróbios em *A. brasilense*, e nem durante tratamentos com a remoção de luz em *R. rubrum*, respectivamente.

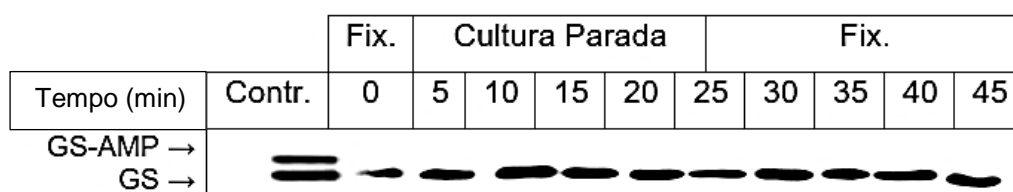


FIGURA 23 - PERFIL DE MODIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GS DE *A. brasilense* SUBMETIDO A ANAEROBIOSE

Fonte: A autora (2016)

Nota: Células de *A. brasilense* FP2 foram cultivadas sob condições de fixação de N_2 . No tempo 0 foram submetidas a um período em anaerobiose (tempo 5 ao 30), e então as condições iniciais foram restauradas (tempo 35 a 45). Alíquotas foram coletadas, processadas e analisadas por Western Blot como descrito no item 5.11, usando anticorpo para anti-GS. As setas indicam as proteínas identificadas. O controle foi obtido de células de *A. brasilense* submetidas ao choque de amônio. GS-AMP indica a proteína GS adenililada.

6.5 LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS PROTEÍNAS PII

Mudanças na localização celular de proteínas foram descritas como parte importante do mecanismo de controle de diversos processos metabólicos em bactérias (SHAPIRO e LOSICK, 2000)

Como descrito anteriormente, o mecanismo de regulação da nitrogenase na presença de altas concentrações de amônio é bem conhecido. Sob condições incompatíveis com a fixação de nitrogênio, DraT catalisa a transferência de um grupamento ADP-ribosil para uma das subunidades de NifH tornando-a inativa. Após reestabelecidas as condições favoráveis para fixação de nitrogênio, a atividade da nitrogenase é restaurada pela remoção do grupamento ADP-ribosil catalisada pela DraG (MOURE *et al.*, 2015).

Em condição de fixação de nitrogênio as proteínas PII, GlnB e GlnZ estão completamente uridililadas e se localizam no citoplasma. Na presença de altas concentrações de amônio GlnB e GlnZ nas suas formas desuridililadas ligam-se a DraT e DraG, respectivamente. Nesta condição a DraT é ativa, catalisando ADP-ribosilação da nitrogenase, inativando-a. A interação de GlnB com DraT regula a atividade de DraT. Além disso, nesta condição a formação do complexo GlnZ-DraG sugere que ele seja sequestrado para a membrana celular, uma vez que existe a formação de um complexo ternário com AmtB, assim como GlnB que também se associa à fração de membrana quando as células recebem um choque de amônio (COUTTS *et al.*, 2002; HUERGO, 2006; JAVELLE *et al.*, 2004).

Considerando os experimentos realizados até esse momento, observou-se que, durante a anaerobiose, a nitrogenase é inativada por ADP-ribosilação e, que esse mecanismo é regulado pelo sistema DraT / DraG, assim como ocorre na presença de íons amônio. Entretanto, apenas no primeiro caso, observou-se que as proteínas GlnZ e AmtB não estão envolvidas nesse processo, o que leva a pergunta, representada pela FIGURA 24, do que seria responsável pela inativação de DraG e sua localização intracelular quando ocorre a depleção de energia.

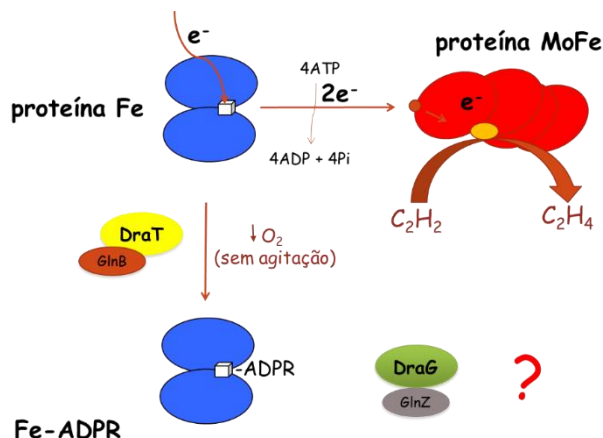


FIGURA 24 - ESQUEMA GRÁFICO DE REGULAÇÃO DA NITROGENASE POR ANAEROBIOSE

Fonte: A autora (2016)

Nota: Com a proteína Fe ativa, a nitrogenase é capaz de reduzir o N₂ atmosférico a amônio. Quando a bactéria é submetida à anaerobiose, ocorre ADP-ribosilação da proteína Fe e, consequente, inativação da nitrogenase. A ligação e a retirada do grupo ADP-ribosil é regulada pelo sistema DraT/DraG. Os sinais moleculares que controlam a ativação e inativação de DraT e DraG nesta situação não são conhecidos.

Para determinar se, como no choque por amônia, as proteínas GlnB, GlnZ e DraG se associam com a fração de membrana em *A. brasilense* quando submetido a anaerobiose, as frações citoplasmática e de membrana foram separadas de células coletadas antes, durante e depois da anaerobiose e analisadas por imunoblot (FIGURA 26 a 28).

Primeiramente, devido à alta similaridade entre as proteínas GlnB e GlnZ (67% de identidade) (HUERGO, 2006), foi determinado se ocorre reação cruzada entre as proteínas GlnB e GlnZ e os anticorpos anti-GlnZ e anti-GlnB, respectivamente. A FIGURA 25 apresenta os resultados obtidos utilizando proteínas purificadas.

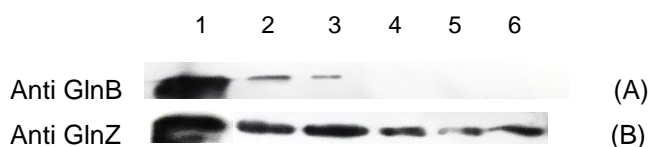


FIGURA 25 - CONTROLE DE REAÇÃO CRUZADA PARA OS ANTICORPOS ANTI-GlnB E ANTI-GlnZ

Fonte: A autora (2016)

Nota: Na Linha 1 são proteínas purificadas de acordo com o anticorpo (aproximadamente 1,5 µg), usado como controle; nas Linhas 2 a 6, concentrações 2,5; 1; 0,5; 0,25 e 0,1 µg de GlnZ (A) e GlnB (B).

Não houve reação cruzada com a proteína GlnZ incubada com o anticorpo anti-GlnB quando foi usado 0,5 µg ou menos, detectou-se um sinal fraco apenas com 2,5 e 1 µg, condições bem acima das concentrações intracelulares *in vivo*. Já a o anticorpo anti-GlnZ foi capaz de detectar a proteína GlnB, em todas as quantidades usadas, inclusive nas 0,25 e 0,1 µg.

Antes da realização do experimento, foi feito um teste com as mesmas amostras observando, por Western Blot, a proteína NifH. O teste comprovou a eficácia do método, pois foi possível observar a presença de uma única banda em condições de fixação de nitrogênio, e a presença de duas bandas nas amostras que foram submetidas à anaerobiose (dados não mostrados).

Inicialmente foi detectada uma banda referente a proteína NifH na fração de membrana, mostrando que a fração estava contaminada, uma vez que NifH está localizada no citoplasma. Foram realizadas, então, lavagens extras da fração de membrana. O sinal da proteína NifH não sumiu completamente mas houve uma redução considerável.

Porém, as proteínas de membrana apresentam dificuldades técnicas associadas à sua extração e solubilidade, assim as amostras não foram fervidas antes da aplicação no gel de eletroforese, foram apenas incubadas a 37 °C durante 10 min, pois temperaturas mais elevadas ou incubações mais longas levaram à agregação da proteína (KAUR; BACHHAWAT, 2009). Após dosagem de proteína, todas as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante.

As frações foram avaliadas por Western Blot, usando o anticorpo contra a proteína de interesse, de acordo com a TABELA 5, e os resultados estão apresentados na FIGURA 26.

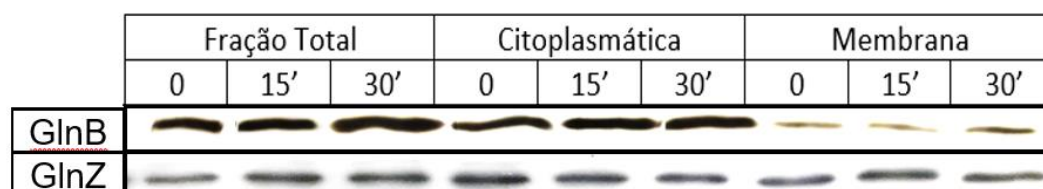


FIGURA 26 - ANÁLISE DAS PROTEÍNAS PII NAS DIFERENTES FRAÇÕES CELULARES DE *A. brasilense* SUBMETIDAS AO CHOQUE ANAERÓBICO

Fonte: A autora (2016)

Nota: Amostras foram coletadas antes (tempo 0), durante (tempo 15) e depois (tempo 30) da cultura ser submetida a anaerobiose. Extratos celulares totais, frações de citoplasma ou membrana foram submetidos a SDS-PAGE seguido de Western blot usando anticorpo para GlnB e GlnZ.

Nos dois casos, antes da cultura ser colocada em anaerobiose (tempo 0), pode-se observar um pequeno sinal para as proteínas GlnB e GlnZ na fração de membrana. Após 15 minutos em anaerobiose, foi, também, observado para ambas as proteínas, porém sem nenhum enriquecimento quando comparado ao sinal no tempo 0, o que mostra que a associação das proteínas PII com a membrana não é estimulada durante a inativação da nitrogenase por anaerobiose. E, nesse caso, as lavagens extras da fração de membrana não mostraram redução nenhuma das bandas observadas. Levando a acreditar que uma pequena parcela, tanto de GlnB como de GlnZ, está sempre associada à membrana. O resultado reforça a sugestão de que a modificação da proteína NifH induzida por amônio e por anaerobiose ocorre por diferentes vias de sinalização, como sugerido em outros trabalhos (HUERGO, 2006; KANEMOTO e LUDDEN, 1984; ZHANG *et al.*, 1993).

Apesar do resultado positivo na reação cruzada de GlnB com o anticorpo anti-GlnZ, ainda seria possível observar interação diferencial com a membrana (FIGURA 26), pois se durante o processo de anaerobiose a proteína GlnB migrasse para a membrana, seria possível observar um enriquecimento da banda na fração de membrana.

Para melhor entender a associação de GlnZ à membrana ainda em estado microaeróbico, seria interessante a análise do estado de modificação da proteína GlnZ, já que segundo Huergo e colaboradores (2005; 2006) a modificação de NifH, dependente de amônio, encontra-se sincronizada com a uridililação/desuridililação das proteínas GlnB e GlnZ, sugerindo que ambas as proteínas só estão ligadas à membrana quando totalmente desuridililadas.

6.6 LOCALIZAÇÃO CELULAR DA PROTEÍNA DRAG DURANTE O DESLIGAMENTO DA NITROGENASE

Para avaliar se a proteína DraG, frente à anaerobiose, também seria sequestrada para a membrana durante o desligamento da nitrogenase no choque anaeróbico, as frações celulares foram analisadas por imunoblot.

As mesmas amostras das frações celulares foram utilizadas para verificar a localização celular de DraG. Porém, uma vez que as enzimas DraT e DraG são expressas em baixos níveis em células selvagens (LOWERY; LUDDEN, 1988; SAARI;

TRIPLETT; LUDDEN, 1984), não foi possível a detecção destas enzimas por western blot (dados não mostrados), sendo necessário o aumento dos níveis de expressão de DraG através do plasmídeo pLHMPTHisGN2, que expressa uma versão da enzima DraT com uma cauda de 6 histidinas na região N-terminal (His-DraT) e a enzima DraG nativa sob controle do promotor *ptac* (HUERGO, 2006).

Células de *E. coli* S17.1 foram transformadas com o plasmídeo pLHMPTHisGN2, e os transformantes foram utilizados para transferir o plasmídeo para a estirpe FP2 por conjugação. Inicialmente, para se determinar o efeito da superexpressão de DraG sobre a atividade da nitrogenase, comparou-se a atividade da nitrogenase da estirpe selvagem (FP2) com a da estirpe FP2 contendo o plasmídeo. Células contendo o plasmídeo, assim como da estirpe selvagem foram cultivadas e a atividade da nitrogenase foi avaliada em meio semi-sólido, como descrito no item 5.3 e 5.7. Nenhuma diferença na atividade da nitrogenase pode ser observada entre a estirpe FP2 e FP2 contendo pLHMPTHisGN2.

Definido então que o plasmídeo não influenciava no processo de fixação de nitrogênio, verificou-se novamente a presença de DraG nas frações citoplasmática e de membrana, nos mesmos tempos. Uma particularidade nesse caso foi que, durante o Western Blot (após a etapa de transferência), extratos celulares totais do mutante *draG* foram adicionados à solução de 5 % de leite em pó em TBST durante a etapa de bloqueio, e também na solução contendo o anticorpo primário (anti-DraG), para bloquear ligações inespecíficas. Entretanto, ainda assim, a quantidade de banda inespecífica prejudicou a interpretação dos resultados, como mostra a FIGURA 27.

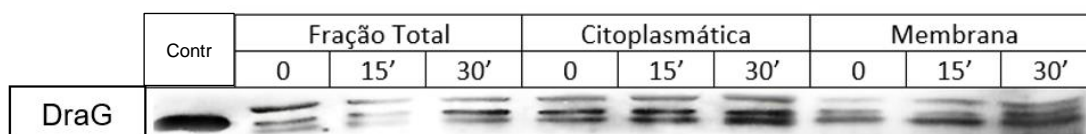


FIGURA 27 - LOCALIZAÇÃO CELULAR DA PROTEÍNA DRAG EM CÉLULAS DE *A. brasilense* FP2 pLHMPTHisGN2.

Fonte: A autora (2016)

Nota: Células de *A. brasilense* FP2 pLHMPTHisGN2 expressando a enzima nitrogenase foram coletadas antes (tempo 0), durante (tempo 15) e depois (tempo 30) da cultura ser submetida a anaerobiose. As alíquotas foram, então, processadas e as frações total, citoplasmática e de membrana foram analisadas por Western Blot. O controle corresponde a 1,5 µg de DraG purificada.

Para reduzir as bandas inespecíficas, as células foram cultivadas com 0,2 mM de IPTG para a expressão de *draT draG*. A atividade da nitrogenase foi, também,

monitorada em meio semi-sólido, a estipe selvagem e FP2 pLHMPTHisGN2 não apresentaram nenhuma diferença com relação aos valores da atividade inicial. As frações celulares foram novamente analisadas como descrito acima, e os resultados obtidos constam na FIGURA 28. Como resultado, a enzima DraG foi encontrada parcialmente associada à membrana em todas as condições. Novamente as lavagens extras das frações de membrana não mostraram redução das bandas. Porém, é possível observar que não houve um enriquecimento da banda de 15' da fração de membrana, sugerindo assim que a DraG não é inativada via formação do complexo com a proteína de membrana, pois não ocorre a migração de DraG dentro da célula.

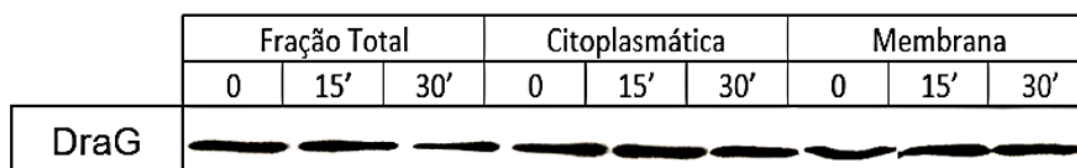


FIGURA 28 - LOCALIZAÇÃO CELULAR DA PROTEÍNA DRAG EM CÉLULAS DE *A. brasilense* FP2 pLHMPTHisGN2 INDUZIDAS COM 0,2 mM DE IPTG

Fonte: A autora (2017)

Nota: Células de FP2 pLHMPTHisGN2 induzidas com IPTG expressando a enzima nitrogenase foram coletadas antes (t_0), durante (t_{15}) e depois (t_{30}) da cultura ser submetida a anaerobiose. As alíquotas foram, então, processadas e aproximadamente 3 µg de proteína das frações total, citoplasmática e de membrana foram aplicadas no gel de eletroforese e analisadas por Western Blot.

6.7 EFEITOS DA AUSÊNCIA DA PROTEÍNA GlnB NA ATIVIDADE DA NITROGENASE

Em *A. brasilense*, a proteína GlnB é necessária para a inativação da nitrogenase por choque de amônio, ativando a enzima DraT, que promove ADP-ribosilação e inativação de NifH (MOURE, 2012). Então, para avaliar o efeito da ausência da proteína GlnB sob a modificação pós-traducional das enzimas NifH em resposta a anaerobiose é importante testar o mutante *glnB* e duplo mutante (*glnZ* e *glnB*) quanto ao desligamento anaeróbico. Porém, na ausência da proteína GlnB, NifH não é expressa porque a proteína ativadora da transcrição dos genes *nif* (NifA) requer GlnB para sua atividade (ARAUJO *et al.*, 2004).

Dessa forma, para estudar os efeitos da ausência da proteína GlnB na modificação pós-traducional da proteína Fe, foi necessário a utilização do plasmídeo pEMS136 que expressa uma forma constitutivamente ativa da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae* (NifA N-truncada) (SOUZA *et al.*, 1999). O plasmídeo foi

transformado em *E. coli* estirpe S17, e transferidos para *A. brasilense* estirpes LFH3 e 7628 (mutantes *glnB*) e 2812 (duplo mutante, *glnB* e *glnZ*) por conjugação.

Para avaliar a eficácia do plasmídeo adicionado, a atividade da nitrogenase dos transconjugantes foi determinada em comparação com a atividade da cultura da estirpe selvagem FP2 em meio semi-sólido, como descrito nos Materiais e Métodos.

Os valores iniciais da atividade, tanto do FP2 como do mutante *glnB* 7628, foram bastante próximos, 57,3 e 54,9 nmol de etileno/ mg.min, porém, houve uma diferença no tempo de atividade máxima. A estirpe de FP2 atingiu a atividade máxima em 20 h e o mutante em 39 h. Já os mutantes LFH3 e 2812 apresentaram atividades mais baixas, cerca de 40 e 60 %, respectivamente, em comparação com o FP2. Porém, essas atividades foram atingidas em aproximadamente 24 h. Concluindo-se que, apesar das diferenças observadas, a inserção do plasmídeo foi bem-sucedida, pois as estirpes foram capazes de fixar nitrogênio, sendo que sem o pEMS136 não houve qualquer vestígio de atividade. Estoques foram feitos, dessas estirpes, para que, futuramente, os experimentos para a complementação desse trabalho sejam realizados, principalmente os que dizem respeito ao papel de GlnB na regulação da proteína DraT durante a depleção de energia, e os efeitos da ausência das proteínas PII (GlnZ e GlnB) ao mesmo tempo, que é o caso do duplo mutante 2812.

7 CONCLUSÕES

- Ensaios de desligamento anaeróbio realizados com os mutantes *glnZ* e *amtB* mostraram que ambos apresentam perfis semelhantes ao da estirpe selvagem. Confirmando, dessa forma, as indicações de que as proteínas GlnZ e AmtB não participam ativamente do mecanismo de inativação anaeróbica da proteína Fe, nem na reativação da nitrogenase quando condições de fixação de N₂ são restabelecidas. Sugerindo haver duas vias de sinalização distintas para restaurar a atividade desta proteína, uma em resposta aos íons amônio e outra à depleção de energia.
- Experimento realizado com a estirpe UB4 (mutante *draG*) confirmou que modificação pós-traducional da nitrogenase por anaerobiose é regulada pelo sistema DraT / DraG, porém as vias de sinalização ainda não foram claramente definidas, pois diferentemente do que ocorre durante o choque de amônio, DraG não é inativada pela formação do complexo com AmtB via GlnZ. Porque, segundo os resultados obtidos com a análise das frações celulares durante a anaerobiose, DraG, GlnZ e GlnB permanecem no citoplasma durante a ADP-ribosilação da nitrogenase. Surgindo assim, hipóteses sobre a regulação do sistema, como, podem ser reguladas pelas alterações na sua acessibilidade ao seu substrato, pela mudança do estado redox ou então pela ligação com metabólito.
- Os níveis de ATP e ADP parecem reduzir bastante quando a cultura é exposta a condições de anaerobiose, sugerindo que a relação ATP/ADP está relacionada ao mecanismo de regulação da atividade da nitrogenase por depleção de energia.
- Os experimentos do controle da atividade da nitrogenase através da adição do CCCP, mostraram que a regulação da proteína Fe por ADP-ribosilação está relacionada à depleção de energia celular. Esse resultado concorda com os obtidos por Kanemoto e Ludden (1984) durante estudos da adição de CCCP em *R. rubrum*. Com o experimento da adição do CCCP pode-se levantar a sugestão de um papel regulador do fluxo de elétrons na inativação da nitrogenase, uma vez que no desligamento anaeróbico, a presença do CCCP diminui os níveis de ATP, interrompendo assim o fluxo de elétrons e a mudança do estado redox, pode desencadear a modificação da proteína Fe
- Glutamina sintetase (GS) não é modificada durante choque anaeróbico sugerindo que os níveis de glutamina não aumentam na mudança para condições anaeróbicas, mostrando não estar envolvida no desligamento em resposta a anaerobiose.

REFERÊNCIAS

- ALAVIAN, K. N. et al. Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1FO ATP synthase. **Nature cell biology**, v. 13, n. 10, p. 1224–33, 2011.
- ARAÚJO, L. M. et al. Different responses of the GlnB and GlnZ proteins upon in vitro uridylylation by the *Azospirillum brasilense* GlnD protein. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 289–294, 2008.
- ARAÚJO, M. S. et al. In vitro uridylylation of the *Azospirillum brasilense* N-signal transducing GlnZ protein. **Protein Expression and Purification**, v. 33, n. 1, p. 19–24, 2004.
- ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 65, n. 1, p. 80–105, mar. 2001.
- ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 16, p. 4830–8, ago. 1996.
- ATKINSON, M. R. et al. Reversible uridylylation of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transcription factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC). **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 45, p. 28288–28293, 1994.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Microbial ecology: fundamentals and applications. **Microbial ecology: fundamentals and applications.**, 1981.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549–579, set. 2005.
- BALDANI, V. L. D. et al. Identification and Ecology of *Herbaspirillum-Seropedicae* and the Closely Related *Pseudomonas-Rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v. 13, n. 1–3, p. 65–73, 1992.
- BARBIERI, P.; GALLI, E. Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. **Research in Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 69–75, jan. 1993.
- BARNEY, B. M. et al. Substrate interaction at an iron-sulfur face of the FeMo-cofactor during nitrogenase catalysis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 51, p. 53621–4, 17 dez. 2004.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum* – plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 103–121, fev. 1997.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum* -plant relationships:

physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521–577, ago. 2004.

BENDER, R. A.; MACALUSO, A.; MAGASANIK, B. Glutamate dehydrogenase: genetic mapping and isolation of regulatory mutants of *Klebsiella aerogenes*. **Journal of bacteriology**, v. 127, n. 1, p. 141–8, jul. 1976.

BENNETT, B. D. et al. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 8, p. 593–599, 28 ago. 2009.

BONATTO, A. C. et al. Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expression and Purification**, v. 55, n. 2, p. 293–299, out. 2007.

BONATTO, A. C. et al. Uridylylation of *Herbaspirillum seropedicae* GlnB and GlnK proteins is differentially affected by ATP, ADP and 2-oxoglutarate in vitro. **Archives of Microbiology**, v. 194, n. 8, p. 643–652, 1 ago. 2012.

BOTHE, H. (HERMANN); FERGUSON, S. J. (STUART J.); NEWTON, W. E. (WILLIAM E. **Biology of the nitrogen cycle**. [s.l.] Elsevier, 2006.

BROWN, M. S.; SEGAL, A.; STADTMAN, E. R. Modulation of glutamine synthetase adenylylation and deadenylylation is mediated by metabolic transformation of the P II -regulatory protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 12, p. 2949–53, dez. 1971.

BULEN, W. A.; LECOMTE, J. R. The nitrogenase system from *Azotobacter*: two-enzyme requirement for N₂ reduction, ATP-dependent H₂ evolution, and ATP hydrolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 56, n. 3, p. 979–86, set. 1966.

BURRIS, R. Nitrogenases. **J. Biol. Chem**, v. 266, n. 15, p. 9339–9342, 1991.

CARVALHO, N. L. DE; ZABOT, V. Nitrogênio: Nutriente Ou Poluente? **Revista Eletronica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 6, n. 6, p. 960–974, 2012.

CHAPMAN, A. G.; FALL, L.; ATKINSON, D. E. Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. **Journal of Bacteriology**, v. 108, n. 3, p. 1072–86, dez. 1971.

CHEAH, E. et al. Structure of the *Escherichia coli* signal transducing protein PII. **Structure**, v. 2, n. 10, p. 981–990, 1994.

CONROY, M. J. et al. The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 4, p. 1213–1218, 2007.

COUTTS, G. et al. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by

the ammonium transporter AmtB. **The EMBO journal**, v. 21, n. 4, p. 536–45, 15 fev. 2002.

DEAN, D. R. et al. Nitrogenase Metalloclusters: Structures, Organization, and Synthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 21, p. 6737–6744, 1993.

DE ZAMAROCZY, M. et al. Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense*. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 14, p. 4143–9, jul. 1996.

DE ZAMAROCZY, M. Structural homologues P(II) and P(Z) of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signalling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. **Molecular microbiology**, v. 29, n. 2, p. 449–63, jul. 1998.

DE ZAMAROCZY, M.; DELORME, F.; ELMERICH, C. Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* in *Azospirillum brasilense*. **Molecular & general genetics : MGG**, v. 224, n. 3, p. 421–30, dez. 1990.

DE ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 9, p. 2507–15, maio 1993.

DETSCH, C.; STÜLKE, J. Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of *NrgA* and *NrgB*. **Microbiology**, v. 149, n. 11, p. 3289–3297, 1 nov. 2003.

DIXON, R. A.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621–631, 2004.

DÖBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. **The Prokaryotes**. 2.ed., v. 3, p. 2236–2253, 1991.

DOBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. **Proceedings of the 1st. Intl. Symp. Nitrogen Fixation**, v. 2, p. 518–538, 1976.

DODSWORTH, J. A.; LEIGH, J. A. Regulation of nitrogenase by 2-oxoglutarate-reversible, direct binding of a PII-like nitrogen sensor protein to dinitrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 26, p. 9779–9784, 27 jun. 2006.

DONG, Z. et al. A Nitrogen-Fixing Endophyte of Sugarcane Stems (A New Role for the Apoplast). **Plant physiology**, v. 105, n. 4, p. 1139–1147, ago. 1994.

EADY, R. R. Enzymology in free-living diazotrophs. **Nitrogen Fixation S.Puhler. Clarendon Press.**, v. 4, p. 1–49, 1986.

ECKERT, B. et al. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 17–26, 2001.

EGENER, T. et al. Role of a ferredoxin gene cotranscribed with the nifHDK operon in N(2) fixation and nitrogenase "switch-off" of *Azoarcus* sp. strain BH72. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 12, p. 3752–60, jun. 2001.

EMBRAPA. **Fixação Biológica de Nitrogênio**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-fixacao-biologica-de-nitrogenio/nota-tecnica>>. Acesso em: 9 jan. 2017.

FAGES, J. **Azospirillum Inoculants and Field Experiments**. [s.l.] CRC Press, 1994.

FIBACH-PALDI, S.; BURDMAN, S.; OKON, Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 326, n. 2, p. 99–108, jan. 2012.

FOKINA, O.; HERRMANN, C.; FORCHHAMMER, K. Signal-transduction protein PII from *Synechococcus elongatus* PCC 7942 senses low adenylate energy charge in vitro. **Biochemical Journal**, v. 440, n. 1, p. 147–156, 15 nov. 2011.

FORCHHAMMER, K. Global carbon/nitrogen control by PII signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 319–33, jun. 2004.

FORCHHAMMER, K. PII signal transducers: novel functional and structural insights. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 65–72, fev. 2008.

FORCHHAMMER, K.; MARSAC, N. T. The P(II) protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 1, p. 84–91, 1994.

GALLOWAY, J. N. et al. The Nitrogen Cascade. **BioScience**, v. 53, n. 4, p. 341–356, 2003.

GERHARDT, E. C. M. Regulação Pós-Traducional Da Enzima Nitrogenase Em *Azospirillum* Brasilense. **Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná**, p. 1–128, 2012.

GILLIS, M. et al. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Acetic Acid Bacterium Associated with Sugarcane. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY**, v. 39, n. 3, p. 361–364, 1989.

GILLIS, M. et al. Polyphasic Taxonomy in the Genus *Burkholderia* Leading to an Emended Description of the Genus and Proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N-Fixing Isolates from Rice in Vietnam. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY**, p. 274–289, 1995.

HALBLEIB, C. M. et al. Effects of perturbations of the nitrogenase electron transfer chain on reversible ADP-ribosylation of nitrogenase Fe protein in *Klebsiella pneumoniae* strains bearing the *Rhodospirillum rubrum* dra operon. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 13, p. 3681–3687, 2000.

HALBLEIB, C. M.; LUDDEN, P. W. Characterization of the interaction of dinitrogenase

reductase-activating glycohydrolase from *Rhodospirillum rubrum* with bacterial membranes. **Archives of microbiology**, v. 172, n. 1, p. 51–8, jul. 1999.

HARTMANN, A.; BURRIS, R. H. Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 3, p. 944–948, 1987.

HARTMANN, A.; FU, H.; BURRIS, R. H. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. **Journal of bacteriology**, v. 165, n. 3, p. 864–70, mar. 1986.

HARTMANN, A.; KLEINER, D. Ammonium (methylammonium) transport by *Azospirillum* spp. **FEMS Microbiology Letters**, v. 15, n. 1, p. 65–67, set. 1982.

HOFFMAN, B. M. et al. Mechanism of Nitrogen Fixation by Nitrogenase : The Next Stage. **Chemical Reviews**, 2014.

HOLLENBECK, P. J.; BRAY, D.; ADAMS, R. J. Effects of the uncoupling agents FCCP and CCCP on the saltatory movements of cytoplasmic organelles. **Cell biology international reports**, v. 9, n. 2, p. 193–9, fev. 1985.

HOWARD, J. B.; REES, D. C. Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. **Chemical reviews**, v. 96, n. 7, p. 2965–2982, 7 nov. 1996.

HSIEH, M.-H. et al. A PII-like protein in *Arabidopsis*: Putative role in nitrogen sensing. **Plant Biology**, v. 95, n. November, p. 13965–13970, 1998.

HUERGO, L. F. et al. Effects of over-expression of the regulatory enzymes DraT and DraG on the ammonium-dependent post-translational regulation of nitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense*. **Archives of Microbiology**, v. 183, n. 3, p. 209–217, 2005.

HUERGO, L. F. et al. Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. **FEBS Letters**, v. 580, p. 5232–6, 2006a.

HUERGO, L. F. et al. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DraG. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 326–337, 2006b.

HUERGO, L. F. Regulação do Metabolismo de Nitrogênio em *Azospirillum brasilense*. **Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná**, 2006.

HUERGO, L. F. et al. Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and the nitrogenase regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 1523–1535, 2007.

HUERGO, L. F. et al. In vitro interactions between the PII proteins and the Nitrogenase Regulatory Enzymes Dinitrogenase Reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) and Dinitrogenase Reductase-activating Glycohydrolase (DraG) in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 11, p. 6674–6682, 2009.

HUERGO, L. F. et al. P II signal transduction proteins: pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 176–190, 2012.

IGARASHI, R. Y.; SEEFELDT, L. C. Nitrogen Fixation: The Mechanism of the Mo-Dependent Nitrogenase. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 351–384, 29 jan. 2003.

JAVELLE, A. et al. Ammonium Sensing in Escherichia coli: ROLE OF THE AMMONIUM TRANSPORTER AmtB AND AmtB-GlnK COMPLEX FORMATION. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 10, p. 8530–8538, 5 mar. 2004.

JAVELLE, A. et al. In vivo functional characterization of the Escherichia coli ammonium channel AmtB: evidence for metabolic coupling of AmtB to glutamine synthetase. **The Biochemical journal**, v. 390, n. Pt 1, p. 215–22, 15 ago. 2005.

JIANG, P.; NINFA, A. J. Sensation and signaling of alpha-ketoglutarate and adenylate energy charge by the Escherichia coli PII signal transduction protein require cooperation of the three ligand-binding sites within the PII trimer. **Biochemistry**, v. 48, n. 48, p. 11522–31, 8 dez. 2009.

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. The Regulation of Escherichia coli Glutamine Synthetase Revisited: Role of 2-Ketoglutarate in the Regulation of Glutamine Synthetase Adenylation State†. **Biochemistry**, v. 37, p. 12802–12810, 1998a.

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. Enzymological Characterization of the Signal-Transducing Uridylyltransferase/Uridylyl-Removing Enzyme (EC 2.7.7.59) of Escherichia coli and Its Interaction with the PII Protein †. **Biochemistry**, v. 37, n. 37, p. 12782–12794, 15 set. 1998b.

JIANG, P.; ZUCKER, P.; NINFA, A. J. Probing interactions of the homotrimeric PII signal transduction protein with its receptors by use of PII heterotrimers formed in vitro from wild-type and mutant subunits. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 13, p. 4354–60, jul. 1997.

KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M. R.; NINFA, A. J. The Escherichia coli PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 30, p. 17797–807, 28 jul. 1995.

KANEMOTO, R. H.; DOWLING, T. E.; LUDDEN, P. W. Factors Affecting the In Vivo Modification of Fe Protein of Nitrogenase in Rhodospirillum Rubrum. In: IN C. VEEGER AND W. E. NEWTON (Ed.). . **Advances in Nitrogen Fixation Research**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1984. p. 153–153.

KANEMOTO, R. H.; LUDDEN, P. W. Effect of ammonia, darkness, and phenazine methosulfate on whole-cell nitrogenase activity and Fe protein modification in Rhodospirillum rubrum. **Journal of Bacteriology**, v. 158, n. 2, p. 713–720, 1984a.

KANEMOTO, R. H.; LUDDEN, P. W. Effect of Ammonia, Darkness, and Phenazine Methosulfate on Whole-Cell Nitrogenase Activity and Fe Protein Modification in *Rhodospirillum Rubrum*. **Journal of Bacteriology**, v. 158, n. 2, p. 713–720, maio

1984b.

KANEMOTO, R. H.; LUDDEN, P. W. Amino acid concentrations in *Rhodospirillum rubrum* during expression and switch-off of nitrogenase activity. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 7, p. 3035–43, jul. 1987.

KAUR, J.; BACHHAWAT, A. K. A modified Western blot protocol for enhanced sensitivity in the detection of a membrane protein. **Analytical Biochemistry**, v. 384, n. 2, p. 348–349, 2009.

KHADEMI, S. et al. Mechanism of Ammonia Transport by Amt/MEP/Rh: Structure of AmtB at 1.35 Å. **Science**, v. 305, n. 5690, p. 1587–1594, 10 set. 2004.

KLASSEN, G. et al. Control of nitrogenase reactivation by the glnZ protein in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 22, p. 6710–6713, 2001.

KLASSEN, G. et al. Nitrogenase switch-off by ammonium ions in *Azospirillum brasilense* requires the GlnB nitrogen signal-transducing protein. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5637–5641, 2005.

KLEINER, D. Bacterial ammonium transport. **FEMS Microbiology Letters**, v. 32, n. 2, p. 87–100, jul. 1985.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 15 ago. 1970.

LANCASTER, K. M. et al. X-ray Emission Spectroscopy Evidences a Central Carbon in the Nitrogenase Iron-Molybdenum Cofactor. **Science**, v. 334, n. 6058, 2011.

LEIGH, J. A.; DODSWORTH, J. A. Nitrogen Regulation in Bacteria and Archaea. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 349–377, out. 2007.

LI, J.; HU, C. Z.; YOCH, D. C. Changes in amino acid and nucleotide pools of *Rhodospirillum rubrum* during switch-off of nitrogenase activity initiated by NH₄⁺ or darkness. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 1, p. 231–237, 1987.

LOWERY, R. G.; LUDDEN, W. Purification and Properties of Dinitrogenase Reductase ADP-Ribosyltransferase from the Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum* ". n. 23, p. 16714–16719, 1988.

LOWERY, R. G.; SAARI, L. L.; LUDDEN, P. W. Reversible regulation of the nitrogenase iron protein from *Rhodospirillum rubrum* by ADP-ribosylation in vitro. **Journal of bacteriology**, v. 166, n. 2, p. 513–8, maio 1986.

LUDDEN, P. W.; BURRIS, R. H. Activating factor for the iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. In: **Science**. [s.l.: s.n.]. v. 194p. 424–426.

LUNDIN, A. Comparison of Methods for Extraction of Bacterial Adenine Nucleotides Determined by Firefly Assay. v. 30, n. 5, p. 713–721, 1975.

MACHADO, H. B. et al. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 549–

553, jul. 1991.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 10ª Edição ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2004.

MAGASANIK, B. The regulation of nitrogen utilization in enteric bacteria. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 51, n. 1, p. 34–40, jan. 1993.

MARTIN, D. E.; REINHOLD-HUREK, B. Distinct roles of P(II)-like signal transmitter proteins and amtB in regulation of nif gene expression, nitrogenase activity, and posttranslational modification of NifH in *Azoarcus* sp. strain BH72. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 8, p. 2251–9, abr. 2002.

MASEPOHL, B.; FORCHHAMMER, K. Regulatory Cascades To Express Nitrogenases. In: **Biology of the Nitrogen Cycle**. [s.l.] Elsevier, 2007. p. 131–145.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 4, p. 604–22, dez. 1995.

MORTENSON, L. E.; MORRIS, J. A.; JENG, D. Y. Purification, metal composition and properties of molybdoferredoxin and azoferredoxin, two of the components of the nitrogen-fixing system of *Clostridium pasteurianum*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 141, n. 3, p. 516–22, 29 ago. 1967.

MOURE, V. R. Controle da atividade da enzima regulatória dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase (DraT) pela proteína GlnB de *Azospirillum brasilense*. **Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.**, p. 1–113, 2012.

MOURE, V. R. et al. The nitrogenase regulatory enzyme dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) is activated by direct interaction with the signal transduction protein GlnB. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 2, p. 279–286, 2013.

MOURE, V. R. et al. Regulation of nitrogenase by reversible mono-ADP-ribosylation. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 384, p. 89–106, 2015.

NINFA, A. J. et al. Integration of antagonistic signals in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Current topics in cellular regulation**, v. 36, p. 31–75, 2000.

NINFA, A. J.; JIANG, P. PII signal transduction proteins: sensors of α -ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 168–173, abr. 2005.

NORDLUND, S. Regulation of nitrogenase activity in phototrophic bacteria by reversible covalent modification. **Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process.**, p. 149–164, 2000.

NORDLUND, S.; HÖGBOM, M. ADP-ribosylation, a mechanism regulating nitrogenase activity. **FEBS Journal**, v. 280, n. 15, p. 3484–3490, 2013.

NORÉN, A.; NORDLUND, S. Changes in the NAD(P)H concentration caused by

addition of nitrogenase “switch-off” effectors in *Rhodospirillum rubrum* G-9, as measured by fluorescence. **FEBS Letters**, v. 356, n. 1, p. 43–45, 14 dez. 1994.

NORÉN, A.; SOLIMAN, A.; NORDLUND, S. The role of NAD⁺ as a signal during nitrogenase switch-off in *Rhodospirillum rubrum*. **The Biochemical journal**, v. 322 (Pt 3), p. 829–32, 15 mar. 1997.

OETJEN, J.; REINHOLD-HUREK, B. Characterization of the DraT/DraG system for posttranslational regulation of nitrogenase in the endophytic betaproteobacterium *Azoarcus* sp. strain BH72. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 11, p. 3726–3735, 2009.

OKON, Y.; ALBRECHT, S. L.; BURRIS, R. H. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. **Journal of bacteriology**, v. 127, n. 3, p. 1248–54, set. 1976.

PEDROSA, F. O. Fixação biológica de nitrogênio: fértil idéia. **Ciência hoje**, v. 6, p. 12–13, 1987.

PEDROSA, F. O. Physiology, biochemistry, and genetics of *Azospirillum* and other root-associated nitrogen-fixing bacteria. **Critical reviews in plant sciences (USA)**, 1988.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (nif) genes of *Azospirillum brasilense* by nifA and ntr (gln) type gene products. **FEMS Microbiology Letters**, v. 23, n. 1, p. 95–101, 1984.

PERLOVA, O. et al. Identification of Three Genes Encoding P. **Society**, v. 185, n. 19, p. 5854–5861, 2003.

PIERRARD, J.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Posttranslational regulation of nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*: Existence of two independent regulatory effects of ammonium. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 5, p. 1358–1366, 1993.

POSTGATE, J. R. The fundamentals of nitrogen fixation. **Cambridge: Cambridge University Press.**, p. 375–85, 1982.

RADCHENKO, M.; MERRICK, M. The role of effector molecules in signal transduction by PII proteins. **Biochemical Society transactions**, v. 39, n. 1, p. 189–194, 2011.

RAJENDRAN, C. et al. Crystal structure of the GlnZ-DraG complex reveals a different form of PII-target interaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 47, p. 18972–18976, 22 nov. 2011.

REES, D. C. et al. Structural basis of biological nitrogen fixation. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 363, n. 1829, p. 971–984, 15 abr. 2005.

REITZER, L. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. In: **F.C. Neidhardt et al.,(ed), Escherichia coli and Salmonella:cellular and molecular biology. ASM Press, Washington D.C.**, p. 391–407, 1996.

RENNIE, R. J. et al. Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp.). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 462–467, maio 1982.

ROSSWALL, T. Microbiological regulation of the biogeochemical nitrogen cycle. **Plant and Soil**, v. 67, n. 1–3, p. 15–34, fev. 1982.

SAARI, L. L.; TRIPLET, E. W.; LUDDEN, P. W. Purification and properties of the activating enzyme for iron protein of nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **The Journal of biological chemistry**, v. 259, n. 24, p. 15502–8, 25 dez. 1984.

SAKAI, H. et al. Crystal structures of the signal transducing protein GlnK from *Thermus thermophilus* HB8. **Journal of Structural Biology**, v. 149, n. 1, p. 99–110, jan. 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning a laboratory manual. **2 ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SANT'ANNA, F. H. Identificação de Genes de *Azospirillum amazonense* diferencialmente expressos em resposta à disponibilidade de nitrogênio. **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2007.

SANT'ANNA, F. H. et al. The PII Superfamily Revised: A Novel Group and Evolutionary Insights. **Journal of Molecular Evolution**, v. 68, n. 4, p. 322–336, 19 abr. 2009.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368–379, nov. 1987.

SEEFELDT, L. C.; HOFFMAN, B. M.; DEAN, D. R. Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase. **Annu Rev Biochem.**, n. 78, p. 701–722, 2009.

SHAPIRO, L.; LOSICK, R. Dynamic Spatial Regulation in the Bacterial Cell. v. 100, p. 89–98, 2000.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. **Bio/Technology**, v. 1, n. 9, p. 784–791, nov. 1983.

SOLIMAN, A.; NORDLUND, S. Studies on the effect of NAD(H) on nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*. **Archives of Microbiology**, v. 157, n. 5, p. 431–435, maio 1992.

SOUPENE, E. et al. Ammonia acquisition in enteric bacteria: physiological role of the ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 12, p. 7030–4, 9 jun. 1998.

SOUZA, E. M. et al. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 2, p. 681–684, 1999.

TANTAMA, M. et al. NIH Public Access. p. 1–25, 2013.

THOMAS, G.; COUTTS, G.; MERRICK, M. The *glnKamtB* operon. A conserved gene pair in prokaryotes. **Trends in genetics : TIG**, v. 16, n. 1, p. 11–4, jan. 2000.

TRUAN, D. et al. A New PII Protein Structure Identifies the 2-Oxoglutarate Binding Site. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, n. 3, p. 531–539, 2010.

UPCHURCH, R. G.; MORTENSON, L. E. In vivo energetics and control of nitrogen fixation: changes in the adenylate energy charge and adenosine 5'-diphosphate/adenosine 5'-triphosphate ratio of cells during growth on dinitrogen versus growth on ammonia. **Journal of Bacteriology**, v. 143, n. 1, p. 274–84, 1 jul. 1980.

VAN DOMMELEN, A. et al. (Methyl)ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 10, p. 2652–9, maio 1998.

VAN DOMMELEN, A. et al. Cloning and characterisation of the *Azospirillum brasilense* *glnD* gene and analysis of a *glnD* mutant. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 266, n. 5, p. 813–820, 1 jan. 2002.

VINHAL-FREITAS, I. C.; RODRIGUES, M. B. Fixação Biológica Do Nitrogênio Na Cultura Do Milho. **Agropecuária Técnica**, v. 31, n. 2, p. 143–154, 2010.

WESTBY, C. A. et al. Assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by *Azospirillum brasilense* grown under nitrogen limitation and excess. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 9, p. 4211–4214, 1987.

XU, Y. et al. GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. **Journal of Molecular Biology**, v. 282, n. 1, p. 149–165, 11 set. 1998.

YILDIZ, Ö. et al. Structure of GlnK1 with bound effectors indicates regulatory mechanism for ammonia uptake. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 2, p. 589–599, 24 jan. 2007.

YUAN, J. et al. Metabolomics-driven quantitative analysis of ammonia assimilation in *E. coli*. **Molecular systems biology**, v. 5, n. 302, p. 302, 2009.

ZHANG, Y. et al. Posttranslational regulation of nitrogenase activity by anaerobiosis and ammonium in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 21, p. 6781–6788, 1993.

ZHANG, Y. et al. Posttranslational regulation of nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* *ntfBC* mutants: Ammonium and anaerobic switch-off occurs through independent signal transduction pathways. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 18, p. 5780–5787, 1994.

ZHANG, Y. et al. Effect of an *ntfBC* mutation on the posttranslational regulation of nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 18, p. 5322–6, set. 1995.

ZHANG, Y. et al. Presence of a second mechanism for the posttranslational regulation of nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* in response to ammonium. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 10, p. 2948–2953, 1996.

ZHANG, Y. et al. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 152, n. 2, p. 195–204, 1997.

ZHANG, Y. et al. Isolation and characterization of *draT* mutants that have altered regulatory properties of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase in *Rhodospirillum rubrum*. **Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 193–202, 2001a.

ZHANG, Y. et al. Functional characterization of three GlnB homologs in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*: Roles in sensing ammonium and energy status. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 21, p. 6159–6168, 2001b.

ZHANG, Y. et al. Regulation of nitrogen fixation by multiple PII homologs in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Symbiosis**, v. 35, n. 1–3, p. 85–100, 2003.

ZHANG, Y. et al. Effect of AmtB homologues on the post-translational regulation of nitrogenase activity in response to ammonium and energy signals in *Rhodospirillum rubrum*. **Microbiology**, v. 152, n. 7, p. 2075–2089, 2006.

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; ROBERTS, G. P. Cloning, sequencing, mutagenesis, and functional characterization of *draT* and *draG* genes from *Azospirillum brasilense*. **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 10, p. 3364–9, maio 1992.

ZHANG, Y.; POHLMANN, E. L.; ROBERTS, G. P. Effect of perturbation of ATP level on the activity and regulation of nitrogenase in *Rhodospirillum rubrum*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 17, p. 5526–5537, 2009.

ZHENG, L. et al. The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17090–5, 2004.

ZHU, Y. et al. Identification of *Rhodospirillum rubrum* GlnB Variants That Are Altered in Their Ability To Interact with Different Targets in Response to Nitrogen Status Signals. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 5, p. 1866–1874, 1 mar. 2006.